

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da indução de autofagia em linhagem de câncer colorretal
tratada com nanopartículas de óxido de zinco

CAMILA CUSTÓDIO LEITE

Caxias do Sul

2017

CAMILA CUSTÓDIO LEITE

Avaliação da indução de autofagia em linhagem de câncer colorretal tratada com nanopartículas de óxido de zinco

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Mariana Roesch Ely e Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Caxias do Sul

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L533a Leite, Camila Custódio

Avaliação da indução de autofagia em linhagem de câncer colorretal tratada com nanopartículas de óxido de zinco / Camila Custódio Leite. – 2017.

73 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Mariana Roesch Ely, João Antonio Pêgas Henriques.

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Óxido de zinco. 4. Cólon (Anatomia) - Câncer. 5. Autofagia. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

CAMILA CUSTÓDIO LEITE

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA EM LINHAGEM DE CÂNCER
COLORRETAL TRATADA COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely e Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

DISSERTAÇÃO APROVADA EM DE DEZEMBRO DE 2017.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Prof. Dr. Wanderson Romão

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Kelly Wilmsen Dalla Santa Spada

Prof. Dr. André Felipe Streck

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”*

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Mariana Roesch Ely, pelo exemplo de professora e pesquisadora, e também pelo apoio e atenção. E principalmente por ser a pessoa que me deu a oportunidade de vivenciar o âmago da pesquisa científica;

Ao meu Orientador Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pelas sábias ideias e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho. Foi uma honra ser orientada pelo senhor;

À minha colaboradora Francine Girardello, por ter me apresentado o fascinante mundo da nanotecnologia, pelo auxílio nas caracterizações, pela parceria e aprendizagens transmitidas desde a iniciação científica;

À Prof^a. Dr^a. Andreia Neves Fernandes da UFRGS pela caracterização química das nanopartículas;

À minha banca de acompanhamento, por acreditarem no potencial desta pesquisa. Prof^a. Dr^a Mirian Salvador, pelo carinho e valiosas sugestões e Prof. André Streck, pela atenção, disposição e contribuições fundamentais para a finalização deste trabalho;

À nossa secretária do PPGB Lucimara Serafini, pelo carinho e incentivo;

À Caroline Menti, que não mediu esforços para me ajudar nos experimentos e pelo mais verdadeiro exemplo de amor e dedicação à ciência em tempo integral;

Às minhas queridas colegas do Laboratório de Gênômica, Proteômica e Reparo de DNA, Rafaela Frassini, Charlene Garcia, Sandra Pavin, Fernanda Munari, Emyle Brum, Caroline Frozza, Giovana Massaroto, Márcia Keller, Jéssica Soldatelli, Tiane Finimundy, Nathália, Alana, Yeslei, Jéssica, Gabriela e Vanessa por toda a ajuda e incentivo de sempre.

Ao meu amigo Ezequiel, pela ajuda com a formatação, pelo apoio de sempre e pelos cafés com risadas nos momentos difíceis;

À minha família, pelo amor e apoio incondicional... À Déia, pela paciência, infinita motivação e por estar sempre ao meu lado. Ao meu irmão Maicon, pelo apoio e por me mandar fotos dos meus gatos nos dias mais complicados. À minha tia-mãe Elisabeth, por compreender a minha ausência, pelas palavras diárias de incentivo ao telefone e pelo exemplo de perseverança. Ao meu pai e maior incentivador Álvaro, por todo o apoio na minha vida acadêmica.

Em especial à minha mãe (*in memoriam*) Loiva, o principal motivo do meu interesse pela pesquisa e a quem dedico este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2. 1. Nanotecnologia	13
2.1.1 Nanopartículas de Óxido De Zinco	14
2.1.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco e Câncer	18
2.2 Endocitose de Nanomateriais	22
2.2.1 Principais vias de endocitose	22
2.2.2 Endocitose de Nanopartículas de Óxido de Zinco.....	26
2.3 Autofagia.....	26
2.3.1 Autofagia e câncer	28
2.4 Considerações gerais sobre o câncer.....	30
3. OBJETIVO GERAL.....	32
3.1 Objetivos específicos	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Capítulo I.....	34
5. DISCUSSÃO GERAL.....	53
6. CONCLUSÕES	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uma visão geral da pinocitose (via não-fagocítica). (Figura adaptada de Stern *et al.*, 2012).....25

Figura 2: Uma visão geral da autofagia evidenciando as fases iniciais do processo de formação do fagóforo e posterior formação do autofagossomo e autofagolisossomo (Figura adaptada de Noboru Mizushima, 2007).....27

CAPÍTULO I

Figure 1. Transmission Electron Microscopy images of ZnO-NP powder in lower (A) and higher (B) magnification. Media dimension of nanoparticles are of about 50 nm.....41

Figure 2. X-Ray diffraction (XRD) pattern of ZnO-NPs. The crystalline wurtzita phase is represented in arrows.....42

Figure 3. Cell viability (MTT assay) of human colon carcinoma (HCT116) exposed to different concentrations of ZnO-NPs for 24, 48 and 72h. Data are of mean \pm SD of triplicate values.....43

Figure 4. Colony forming ability of HCT116 cells treated for 24, 48 and 72h with ZnO-NPs.....43

Figure 5. Morphological analysis of human colorectal cancer cells after increase concentrations of ZnO-NP monitored through phase contrast microscopy. A) Control; B) $10\mu\text{g mL}^{-1}$; C) $15\mu\text{g mL}^{-1}$; D) $20\mu\text{g mL}^{-1}$ and E) $30\mu\text{g mL}^{-1}$44

Figure 6. Increase in LC3A/B expression compared to GPDH in human colorectal cancer cells with IC50 after different incubation time (6h, 12h, 18h) exposures to ZnO-NPs.....45

Figure 7. Increase in LC3A/B expression pattern in human colorectal cancer cells after exposure to a range of ZnO-NP concentration ($0-25\mu\text{g mL}^{-1}$). Note that positive control with Rapamycin (100nM) showing similar expression pattern compared to the higher

concentration (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ZnO-NP. Negative control (without ZnO-NP) is also represented in first line.....46

Figure 8. Schematic plot highlighting possible mechanism of endocytosis and autophagy of ZnO-NPs. ZnO-NPs can be internalized through receptor-mediated endocytosis (1), followed by the fusion of the endosome with the lysosome where ZnO-NPs (2) degradation and Zn^+ release of the ions into the cytosol (3). In the cytosol, Zn^+ and ZnO-NPs can cause oxidative stress by generating ROS (4), damaging cellular organelles, the cell membrane through lipid peroxidation (5) and causing DNA damage (6). ZnO-NPs also induce autophagy and be internalized in autophagosomes (7). Damage to cell organelles and hyperstimulated autophagy caused by Zn^+ and ZnO-NPs can lead to cell death (8). (Guan *et al.*, 2012, Sabella *et al.*, 2014, Ray *et al.*, 2014, Mihai *et al.*, 2015, Taccola *et al.*, 2011, Girardello *et al.*, 2016).....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos indicando estresse oxidativo causado por ZnO-NPs em diferentes linhagens celulares.....16

Quadro 2: Diferentes estudos *in vitro* com NPs óxido metálicas com atividade anticancerígena (adaptada de Vinardell & Mitjans, 2015).....20

CAPÍTULO I

Frame 1. Physical-chemical parameters of solutions in different ZnO-NP concentrations.....42

LISTA DE ABREVIATURAS

ATG	Genes relacionados a autofagia (<i>Autophagy-related genes</i>)
Atg	Proteínas relacionadas à autofagia (<i>Autophagy-related proteins</i>)
CAT	Catalase
CRC	Cânceres colorretais esporádicos
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRX	Difração de Raios X
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FIP200	Proteína de interação com a família FAK (quinase de adesão local) de 200 kD
GPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione S transferase
GTPase	Família de enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam guanosina trifosfato
IC50%	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC3-I/II	Formas I e II de cadeia leve 3 das proteínas associadas a microtúbulos 1A e 2A
LPO	Peroxidação lipídica
MAP1-LC3	<i>Protein microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólico
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PI3KIII	Fosfatodilinositol-3-quinase classe III
PIP3	Fosfatodilinositol-3-fosfato
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PZ	Potencial Zeta
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino

SOD	Superóxido dismutase
Ulk1	Quinase Unc-51-like 1
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B

RESUMO

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) têm atraído a atenção da nanomedicina devido às suas promissoras propriedades anticancerígenas, resultado de sua característica eletrostática e da geração de espécies reativas de oxigênio, aliadas a um processo de síntese relativamente fácil e econômico. Os mecanismos moleculares dos efeitos de ZnO-NPs em células tumorais ainda não estão bem definidos, sendo que um dos processos envolvidos que vem sendo investigado é o papel da autofagia. Neste estudo, foram investigados os efeitos citotóxicos de ZnO-NPs em células de carcinoma de cólon humano (HCT-116) e indução de autofagia. A caracterização das ZnO-NPs, adquiridas comercialmente foi confirmada através da presença de estrutura cristalina wurtzita pela técnica de Difração de Raios-X e seu tamanho aproximado de 50 nm por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As dispersões de ZnO-NPs em meio DMEM apresentaram baixa estabilidade com tendência a aglomeração pela análise de Potencial Zeta e aumento do tamanho hidrodinâmico revelada por Dispersão de Luz Dinâmica. Observou-se uma redução da viabilidade celular na dependente da concentração no ensaio MTT, assim como a formação de colônias foi afetada progressivamente com o aumento da concentração de ZnO-NPs no ensaio clonogênico. Alterações na morfologia celular como perda de adesão e retração do citoplasma foram observadas por microscopia óptica na presença de concentrações crescentes de ZnO-NPs. A análise de *western blot* foi realizada para investigar a autofagia, revelando um aumento progressivo da expressão da proteína LC3 após 6, 12 e 18h de incubação com o IC50 obtido no ensaio MTT, confirmados por teste indireto de imunofluorescência, que aumentou similarmente o padrão de expressão de LC3A/B nas maiores concentrações (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados indicaram que ZnO-NPs foi capaz de promover efeitos citotóxicos na linhagem celular de carcinoma colorretal humano HCT-116 e induzir autofagia a uma concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em face a carência de estudos indicando o mecanismo de ação após exposição à ZnO-NPs em células de câncer colorretal, os dados aqui apresentados podem contribuir na elucidação dos efeitos das nanopartículas em células tumorais, podendo direcionar novos estudos para melhor entender o papel da autofagia induzida por ZnO-NPs.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanopartículas de óxido de zinco, câncer colorretal, antitumoral, autofagia

ABSTRACT

Nanoparticles of zinc oxide (ZnO-NPs) have attracted the attention of nanomedicine due to its promising anticancer properties, resulting from its electrostatic characteristic and the generation of reactive oxygen species, combined with a relatively easy and economical synthesis process. The molecular mechanisms of the effects of ZnO-NPs on tumor cells are still not well defined, and one of the processes involved that has been investigated is the role of autophagy. In this study, the cytotoxic effects of ZnO-NPs on human colon carcinoma cells (HCT-116) and induction of autophagy were investigated. The characterization of the commercially acquired ZnO-NPs was confirmed with the presence of wurtzite crystal structure by the X-ray Diffraction technique and its approximate size of 50 nm by Transmission Electron Microscopy. The dispersions of ZnO-NPs in DMEM medium showed low stability with tendency to agglomeration by zeta potential analysis and increase of the hydrodynamic size revealed by Dynamic Light Scattering. A concentration-dependent cell viability reduction was observed in the MTT assay, as colony formation was progressively affected with increasing ZnO-NP concentration in the clonogenic assay. Alterations in cell morphology such as loss of adhesion and cytoplasmic retraction were observed by optical microscopy in the presence of increasing concentrations of ZnO-NPs. Western blot analysis was performed to investigate autophagy, revealing a progressive increase in LC3 protein expression after 6, 12 and 18h incubation with IC₅₀ obtained in the MTT assay, confirmed by indirect immunofluorescence test, which similarly increased the expression pattern of LC3A/B at higher concentrations (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The results indicated that ZnO-NPs was able to promote cytotoxic effects on the HCT-116 human colorectal carcinoma cell line and induce autophagy at a concentration of 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Due to the lack of studies indicating the mechanism of action after exposure to ZnO-NPs in colorectal cancer cells, the data here presented may contribute to the elucidation of the effects of nanoparticles on tumor cells and may direct further studies to better understand the role of autophagy induced by ZnO-NPs.

Keywords: nanotechnology, nanoparticles of zinc oxide, colorectal cancer, antitumoral, autophagy

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é um dos cânceres que acomete com maior frequência a população brasileira e mundial. No Brasil, ele é o segundo tipo mais comum em mulheres e o terceiro em homens, com diferenças de incidência entre as grandes regiões do país. Na procura por novos agentes terapêuticos, a nanomedicina vem se destacando ao trazer possibilidades inovadoras ao aperfeiçoar nanoestruturas com o objetivo de melhorar o efeito de drogas e reduzir os efeitos colaterais de tratamento contra o câncer.

Entre as nanopartículas de óxidos metálicos utilizadas na busca de novas classes de agentes antitumorais, as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) vem chamando a atenção ao trazer resultados promissores devido ao conjunto de suas características particulares, como propriedades fotocatalíticas, carga eletrostática e promoção da geração de espécies reativas de oxigênio, além do processo de síntese ser relativamente fácil e da possibilidade de serem obtidas a baixo custo.

Os mecanismos moleculares dos efeitos de ZnO-NPs em células tumorais ainda não estão bem definidos, sendo que um dos processos envolvidos que vem sendo investigado é o papel da autofagia. As ZnO-NPs podem ser internalizadas nas células através da endocitose e posteriormente degradadas em lisossomos, e também podem sofrer sequestro autofágico. A autofagia é um processo em que a célula degrada seus próprios constituintes celulares danificados em vacúolos denominados autofagolisossomos, fornecendo energia para a célula e ajudando na sobrevivência em condições de estresse. No entanto, em períodos prolongados de estresse e autoconsumo celular, a autofagia pode influenciar no processo de morte celular. Muitos trabalhos indicam que ZnO-NPs de diferentes formas e tamanhos induzem a autofagia em células tumorais, mas seus mecanismos e papel na morte celular são controversos, pois há trabalhos indicando que as células tentam sobreviver realizando autofagia de organelas danificadas por ZnO-NPs, mas não conseguem e acabam sofrendo apoptose. Outros estudos indicam que os íons de zinco, resultado da degradação nos lisossomos podem danificar os mesmos e causar disfunção do fluxo autofágico. Também há trabalhos relatando que a morte celular pode ocorrer devido a um tipo de autofagia hiperestimulada.

Em um contexto em que a relação entre ZnO-NPs e autofagia ainda não está bem elucidada e também devido a baixa representatividade de estudos relacionados a autofagia induzida por nanopartículas de zinco em células de carcinoma colorretal, realizou-se a caracterização das ZnO-NPs e buscou-se avaliar a sua citotoxicidade e indução de autofagia em linhagem celular de câncer colorretal HCT-116.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. Nanotecnologia

Para muitos, a nanotecnologia começou em 1959 com o físico Richard Feynman durante o encontro anual da Sociedade Americana de Física onde ele afirmou que cientistas poderiam manipular átomos individualmente, construir estruturas nanométricas e aplicá-las onde quisessem (Toumey, 2008). Mais tarde, em 1974, Norio Taniguchi introduziu o termo “nanotecnologia” e Kim Drexler, em 1986, publica o livro “Engines of Creation” no qual faz uso do termo de uma forma mais semelhante à atual (Leinonen & Kivisaari, 2010).

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que consiste na caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (Sahoo *et al.*, 2007). A literatura descreve nanopartículas (NPs) como estruturas que possuem pelo menos uma dimensão na ordem de 1 a 100 nanômetros (nm) (Clemente *et al.*, 2012; Bondarenko *et al.*, 2013), sendo que o prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades físico-químicas únicas, como tamanho reduzido, aumento específico da área de superfície e um grande potencial de reatividade (Bondarenko *et al.*, 2013). O aumento da área de superfície, uma das características mais exploradas em nanotecnologia se dá pelo aumento da razão entre a área e o volume do material. Por exemplo, um cubo com uma aresta de 1 centímetro tem o volume de 1 cm³ e uma área de 6 cm². Se o material que constitui o cubo for dividido em pequenos cubos de 100 nm de aresta, teremos o mesmo volume total, mas a área total de exposição, somados todos os nanocubos, será de 60 m², que representa uma área de contato com o ambiente da mesma quantidade de material 100 mil vezes maior (Schulz, 2013).

Devido ao tamanho dos nanomateriais, comparável as macromoléculas encontradas nas células, as nanopartículas facilitam as interações com biomoléculas e potencialmente alteram a função celular das mesmas (Wingett *et al.*, 2016). Neste cenário, a nanomedicina surgiu com muitas aplicações sendo descritas na literatura, utilizando nanomateriais na engenharia de tecidos, biossensores, diagnóstico e dispositivos em nano escala para liberação de drogas (Wagner *et al.*, 2006; Xiong, 2013).

Atualmente, vários estudos clínicos com nanopartículas estão sendo realizados, principalmente destinados ao tratamento do câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares,

neurológicas e ao combate da AIDS. A doença-alvo mais recorrente é o câncer de mama, as nanopartículas mais estudadas são as de albumina e o fármaco mais estudado é o paclitaxel (ABDI, 2013).

Para o desenvolvimento da nanotecnologia, é fundamental a utilização de metodologias analíticas rigorosas para conhecer as características físico-químicas de cada tipo de nanopartícula estudada, pois sua atividade biológica pode ser alterada radicalmente com a variação de algumas propriedades, como tamanho, área superficial e capacidade de aglomeração/dispersão. Por exemplo, nanopartículas agregadas se comportam de forma diferente dentro de sistemas biológicos comparando com nanopartículas individuais. Em soluções, como sangue, saliva e meios de cultura, a superfície das nanopartículas agregadas são mudadas dinamicamente com base na afinidade de ligação com biomoléculas. Além disso, as nanopartículas individuais podem ser naturalmente revestidas com várias biomoléculas, formando um complexo proteína-nanopartículas, evitando que se agreguem (Oh & Park, 2014).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permite a análise por imagem das características morfológicas e de tamanho das NPs. A técnica de Difração de Raios X (DRX) determina a estrutura cristalina dos materiais. Para a caracterização de uma solução contendo NPs, pode ser empregada a técnica de *Dinamic Light Scattering* (DLS), que possibilita a análise da distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas e de Potencial Zeta, que mensura a carga elétrica das NPs fornecendo informações sobre sua estabilidade no sistema (Girardello *et al.*, 2016).

Devido as propriedades físico-químicas de nanopartículas óxido metálicas, como as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs), a sua utilização vem ganhando interesse nas comunidades científicas e médicas como agentes biomédicos autônomos ou em combinação com diferentes terapias, como quimioterapia e radiação (Rasmussen *et al.*, 2010, Vinardell & Mitjans, 2015).

2.1.1 Nanopartículas de Óxido De Zinco

O ZnO é um semicondutor convencional de banda larga altamente explorado em várias áreas da ciência. As ZnO-NPs podem exibir uma grande variedade de nanoestruturas e são muito utilizadas em diferentes materiais. Em cosméticos, elas são muito utilizadas devido à sua eficiência em absorver tanto raios UV-A e UV-B (Tran *et al.*, 2011). Em tecidos, tem

aplicação voltada a capacidade antimicrobiana para evitar o odor (Becheri *et al.*, 2008; Clausen *et al.*, 2010). Também são utilizadas em cerâmicas, nas instalações para tratamento de água (Ghodake *et al.*, 2011), na degradação de poluentes ambientais (Xu *et al.*, 2007), em nanosensores (Cash *et al.*, 2010), catalisadores (Strunk *et al.*, 2009) e em dispositivos eletrônicos (Hernandez *et al.*, 2008).

Os mecanismos de citotoxicidade das ZnO-NPs não são completamente compreendidos, mas a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é considerada um componente importante (Tabela 1), pois causa estresse oxidativo e, eventualmente, morte celular (Rasmussen *et al.*, 2010). A homeostase redox celular é mantida pelo equilíbrio entre a produção de ROS e o sistema antioxidante na célula. Quando ROS são produzidos em excesso ou a capacidade antioxidante da célula é diminuída, a oxidação causa efeitos nocivos, resultando em estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2014). As mitocôndrias são a principal fonte de ROS. Uma vez que o nível de ROS é excedido, a integridade mitocondrial e as estruturas da membrana são danificadas e, em última instância, o sistema de equilíbrio redox fica comprometido, o que eventualmente leva a disfunção mitocondrial e também causa danos severos às macromoléculas celulares, especialmente o DNA (Unfried *et al.*, 2007).

A extensão do dano do DNA determina o destino das células, levando a parada do ciclo celular, reparo do DNA ou ativação de caminhos apoptóticos (Wood *et al.*, 2005; Pati *et al.*, 2016). A perda de potencial de membrana mitocondrial leva à exposição do citocromo c ao espaço intermembrana ativando as caspases (Gottlieb *et al.*, 2003). O excesso de dano celular causado por ROS pode levar à morte celular mediante a autofagia hiperestimulada e autoconsumo celular (Turcotte *et al.*, 2014). Portanto, a geração de ROS é um ponto importante tanto para a apoptose quanto para a autofagia, que levam à morte celular (Mathew & White, 2011).

Quadro 1. Estudos indicando estresse oxidativo causado por ZnO-NPs em linhagens celulares tumorais e não tumorais. Palavras-chave: oxidative stress, zinc oxide nanoparticles, cells, *in vitro*, cancer.

Linhagem Celular	Tamanho das ZnO-NPs	Concentrações	Viabilidade Celular	Marcadores de Estresse Oxidativo	Autores (Revista)
Células epidérmicas humanas (A431)	30 nm	MTT 24 e 48h (0,8, 5 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	24 h - 91%, 52% 25% 48h - 86%, 42% e 9%	GSH: esgotamento dose dependente CAT: 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - queda de 64% ; 0,08 e 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ também exibiram diminuição de 55% e 36% SOD: não foi significativa	Sharma <i>et al.</i> , 2009 (Toxicology Letters)
Adenocarcinoma alveolar humano (A549)	52 nm	MTT 24, 48h (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	24h- 73%, 60%, 49% e 41% 48h- 61%, 48%, 38% e 27%	ROS – aumento dependente do tempo e da dose GSH: esgotamento LPO, SOD e CAT: aumento dependente do tempo e da dose	Ahamed <i>et al.</i> , 2011(Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine)
Células de hepatocarcinoma humano (HepG2)	21 nm	MTT 24h (5, 10 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 39%	15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h – aumento de ROS e LPO GSH: redução GPx, GR, SOD e CAT: diminuição	Akhtar <i>et al.</i> , 2012 (Nanomedicine)
Hepatócitos humano (L02) e Rim embrionário humano (Hek-293)	50 nm	L02: 24h (50, 75, e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) Hek-293: 24h (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	L02-52,63%, 41,12%, e 36,70% Hek-68,36%, 38,74%, 19,43%, e 15,21%	GSH - esgotamento dependente da dose; SOD reduziu em concentrações acima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (L02) e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HEK293)	Guan <i>et al.</i> , 2012 (Nanoscale Research Letters)
Células neuronais humanas (SHSY5Y)	273 nm	MTT 6, 24, 48 h (0–80 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em todos os tempos de tratamento	Cometa com enzima OGG1 (3 e 6h) - aumento de danos	Valdiglesias <i>et al.</i> , 2013 (Food and Chemical Toxicology)

Macrófagos de camundongos	50 nm	Não informado	Não informado	ROS: 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 3h LPO e proteína carbonil: aumento significativo GPx e GST-diminuição significativa CAT e GR -Inibição gradual	Roy <i>et al.</i> , 2014 (Toxicology Letters)
Células gliais de C6 de rato	<10 nm	MTT 24h (5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu 40%	ROS: Aumento máximo em 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 h e declínio de em 6 h a 24h	Sruthi & Mohanan (2015) (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces)
Linhagem celular monocítica humana (THP-1)	30 nm	MTT 3, 6, 24h (0,5,1,5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	20 mg/mL – depois de 3, 6 e 24 h	15 e 20 mg/mL, 6h: ROS: aumento dependente GSH: redução -aumento de nitritos	Senapati <i>et al.</i> , 2015 (Food and Chemical Toxicology)
Câncer cervical humano (HeLa)	10 nm	SRB 48h (0,001–0,07 mg/ml)	~IC50 - 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$	ROS - aumento dependente da dose	Pandurangan <i>et al.</i> , 2016 (Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology)
Câncer de ovário humano (SKOV3)	20 nm	MTT 12, 24h (5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Redução significativa em 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0, 5, 10, 20, e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 12 h – aumento de ROS dependente da concentração	Bai <i>et al.</i> , 2017 (International Journal of Nanomedicine)
Células de adenocarcinoma de pulmão (A549)	~ 50 nm	MTS 12, 24h (10, 30 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Redução significativa em 30 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24h - elevação significativa no nível ROS	Zhang <i>et al.</i> , 2017 (Cell Death and Disease)

2.1.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco e Câncer

Embora as ZnO-NPs sejam utilizadas por muito tempo na indústria de cosméticos, recentemente elas estão sendo exploradas em estudos no tratamento de câncer e em outras aplicações biomédicas devido as suas propriedades fotocatalíticas, *gap* de banda favorável, carga eletrostática, promoção da geração de espécies reativas de oxigênio, biocompatibilidade e são biodegradáveis (Rasmussen *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2017). Além disso, ZnO é comparativamente barato e relativamente menos tóxico em comparação com outras NPs de óxido de metais (Hanley *et al.*, 2008; Aksoy *et al.*, 2010). Sahdev *et al.*, 2013 também relataram que o zinco não interage com a maioria das moléculas ativas disponíveis.

Segundo Xiong (2013), alguns dos principais desafios na utilização de ZnO-NPs na nanomedicina, são a obtenção de nanocarreadores que sejam estáveis *in vivo*. Como as ZnO-NPs são instáveis na água e podem ser dissolvidas em uma solução ácida fraca (pH <6), a modificação da sua superfície é crucial para proteger as nanopartículas em sistemas biológicos. A modificação apropriada deve conter uma camada hidrofóbica, isolando a ZnO-NP da água e a outra camada externa hidrofílica, para a tornar dispersável em água. Além disso, o método de preparação também é crucial porque as ZnO-NPs podem agregar e decompor durante as reações químicas.

Outro desafio, segundo Xiong (2013), é a toxicidade das ZnO-NPs. Embora o ZnO tenha sido aprovado para uso cosmético pela FDA, o perfil toxicológico detalhado e o mecanismo de citotoxicidade para os nanomateriais de ZnO ainda não são bem elucidados (Rasmussen *et al.*, 2010). Muitos estudos se concentraram na biocompatibilidade de nanomateriais de ZnO sem revestimento superficial e modificações. Por exemplo, foi relatado que ZnO-NPs apresentaram efeito citotóxico devido ao aumento da concentração de Zn²⁺ gerados nos lisossomos devido à degradação das ZnO-NPs (Muller *et al.*, 2010). Guan *et al.* (2012) relataram que ZnO-NPs apresentaram toxicidade na linhagem não tumoral HEK293 e Sharma *et al.* (2009) concluíram que ZnO-NPs causam citotoxicidade em células epidérmicas humanas. No entanto, tal vazamento de Zn²⁺ iônico no sistema biológico resultante da dissolução do ZnO pode ser bem tolerado uma vez que ~10 mg/dia de Zn²⁺ são necessários para adultos. E testes *in vivo* de injeção em camundongos indicaram que essas nanopartículas não apresentaram elevada toxicidade (Xiong, 2013). Também é importante lembrar que o zinco é coeficiente de mais de 300 enzimas de mamíferos, desempenhando um papel importante na manutenção de processos celulares, como estresse oxidativo, replicação do

DNA, reparo do DNA, progressão do ciclo celular e apoptose. Logo, é evidente que alterações nos níveis de zinco nas células possam causar um efeito deletério (Bisht & Rayamajhi, 2016).

Enquanto isso, devido as características físico-químicas e a necessidade urgente de desenvolver novas classes de agentes anticancerígenos, estudos recentes mostraram que ZnO-NPs são uma promessa considerável. Ahamed *et al.* (2011), relataram efeitos apoptóticos em células de adenocarcinoma alveolar humano (A549). Em estudos diferentes, Aktar *et al.* (2012), Sharma *et al.* (2012) e Yuan *et al.* (2014) relataram que ZnO-NPs causam citotoxicidade e indução de apoptose em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Pandurangan *et al.* (2016) relataram efeitos citotóxicos de ZnO-NPs em células tumorais de câncer cervical humano (HeLa). Hanley *et al.* (2008) concluíram em seu estudo que as nanopartículas apresentaram uma forte capacidade preferencial de matar células T cancerígenas em comparação com as células T normais, sugerindo um potencial animador de ZnO-NPs como novas alternativas à quimioterapia e radioterapia.

Além desses estudos comprovando a ação antitumoral das ZnO-NPs, ao analisar o Quadro 2, comparando-as com outras nanopartículas óxido metálicas, é possível constatar mais alguns fatores que as tornam ótimas candidatas para o tratamento moderno do câncer. Devido suas propriedades eletrostáticas intrínsecas, não dependem de luz ultravioleta para produzir EROs, como as TiO₂ que requerem UV, limitando o uso de tal terapia em humanos (Thevenot *et al.*, 2008), além de apresentarem elevada citotoxicidade em células tumorais a concentrações muito baixas (Thevenot *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2012, Wahab *et al.*, 2014). As nanopartículas de óxido de cobre também causam estresse oxidativo pela produção de EROs em células tumorais, porém é necessário doses mais elevadas (mg/ml) para diminuir a viabilidade celular comparado as concentrações de ZnO-NPs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) necessárias (Wang *et al.*, 2013, Sidiqqi *et al.*, 2013). Já as nanopartículas de óxido de ferro, além de possuírem um preço alto, requerem radiação ou magnetismo para causarem estresse oxidativo (Klein *et al.*, 2014). As NPs de óxido de cério também possuem um preço elevado e necessitam de concentrações mais altas para causarem citotoxicidade em células tumorais comparadas as ZnO-NPs (Wason *et al.*, 2013, Ali *et al.*, 2014).

A cotação, atividade citotóxica dessas nanopartículas e a relação com suas principais propriedades anticancerígenas está apresentada no Tabela 2.

Quadro 2: Diferentes estudos *in vitro* com NPs óxido metálicas com atividade anticancerígena (adaptada de Vinardell & Mitjans, 2015)

Tipos de NPs	Propriedades	Cotação (Sigma-Aldrich)	Linhagem celular	Tamanho	Viabilidade celular	Autores (Revista)
Dióxido de Titânio	Terapia fotodinâmica, produzindo EROs		Carcinoma de pulmão de Lewis LLC e célula de melanoma de camundango B16F10	21 nm	LLC e B16F10 (10 mg/ mL, 24h) redução de >75% e 50%	Thevenot <i>et al.</i> , 2008 (Nanomedicine)
Óxido de Cobre	Geração de EROs.	Código 544868 (< 50 nm) - R\$ 570,00 (25g)	Câncer cervical HeLa	40–110 nm	HeLa IC50 (48h) 8.28 mg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2013 (Cell Death Dis)
			Hepatocarcinoma humano HepG2	22 nm	2, 5, 10, 25 e 50 mg/ml (24h) –83%, 69%, 52%, 34% e 28%	Sidiqui <i>et al.</i> , 2013 (PLoS ONE)
			Adenocarcinoma alveolar humano A549	577 nm	IC50 (36h) 200 µg mL ⁻¹	Sankar <i>et al.</i> , 2014 (Mater. Sci. Eng.)
Óxido de Ferro	Radiação ou campos magnéticos	Código 900026-R\$ 2,228.00 (10mL)	Adenocarcinoma colorretal epitelial humano Caco-2 e câncer de mama MCF-7	9–20 nm	Não informado	Klein <i>et al.</i> , 2014 (J. Phys. Chem.)
Óxido de Zinco	Propriedades eletrostáticas intrínsecas, produzindo grandes quantidades de EROs.	Código 544906 (<100 nm) - R\$ 247,00 (10g) Código 677450 (<50 nm) - R\$ 344,00 (5g)	Hepatocarcinoma humano HepG2	30 nm	IC50- 14,5 µg mL ⁻¹	Sharma <i>et al.</i> , 2012 (Apoptosis)
			Hepatocarcinoma humano HepG2 e câncer de mama MCF-7	Não informado	25 µg mL ⁻¹ (24h) HepG2 – redução de 95%	Wahab <i>et al.</i> , 2014 (Colloids Surf.)

					MCF-7- redução de 96%	
Óxido de Cério	Radiação. Toxicidade específica para células cancerígenas	Código 643009 (<25 nm)- R\$ 1,860.00 (100mL)	Câncer de pâncreas L3.6pl	5–8 nm	(10 μ M, 24h) NPs sozinhas: redução de 12,5% NPs com radiação: redução adicional de 12,9%	Wason <i>et al.</i> , 2013 (Nanomedicine)
			Melanoma A375	3–5 nm	120 μ g mL ⁻¹ , 24h – ~80%	Ali <i>et al.</i> , 2014 (Cell Biochem. Biophys.)

2.2 Endocitose de Nanomateriais

Nas células eucarióticas, o principal mecanismo de internalização de partículas é a endocitose. Normalmente as células utilizam-se da endocitose para internalizar nutrientes, realizar transdução de sinais, modular a composição da membrana plasmática, reciclar receptores de membrana e fazer o transporte através de células endoteliais. Este mecanismo também é utilizado na internalização de nanomateriais (Stern *et al.*, 2012, Ferreira *et al.*, 2014).

A endocitose pode ser classificada em fagocitose e pinocitose. A fagocitose é desempenhada exclusivamente por células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos. Nesse processo, as células internalizam materiais exógenos, formando um fagossomo que será processado no interior da célula. Já na pinocitose, presente em todos os tipos celulares, a vesícula endocitada é chamada de endossomo (Doherty & McMahon, 2009). Este sistema pode ocorrer por vários mecanismos reconhecidos - mediada por clatrina, endocitose, mediada por caveolina, macropinocitose e mecanismos independentes de clatrina e caveolina (Stern *et al.*, 2012). Os principais mecanismos de pinocitose (via não-fagocítica) podem ser vistos na **Figura 1**.

Vários processos endocíticos podem ocorrer simultaneamente em uma célula e o mecanismo de absorção de uma nanopartícula pode variar dentro e entre diferentes tipos de células (Hillaireau & Couvreur, 2009). A internalização do material será determinada por suas propriedades físico-químicas como tamanho, composição química, carga, funcionalização da superfície, reatividade superficial e adsorção superficial (Jiang *et al.*, 2010).

2.2.1 Principais vias de endocitose

A endocitose mediada por clatrina é, provavelmente, o principal mecanismo de internalização celular de nanopartículas (Li *et al.*, 2008). A via é responsável pela absorção de vários nutrientes essenciais à sobrevivência celular, internalização de complexos de receptores de membrana, transportadores de metais, moléculas de adesão, receptores de sinalização, neurotransmissores, patógenos, antígenos, lipoproteínas e etc (Sahay *et al.*, 2010).

O mecanismo de internalização envolve a formação de uma vesícula a partir da polimerização de uma proteína citosólica chamada clatrina-1, composta por estruturas denominadas detrisquélions que configuram-se para gerar uma estrutura hexagonal e pentagonal, que propicia a formação da curvatura da membrana. A vesícula revestida por

clatrina possui aproximadamente 100-200 nm de diâmetro, sendo formada a partir da constrição da membrana invaginada pela GTPase dinamina, que libera a vesícula no citoplasma (Mc Mahon *et al.*, 2011). Nesse processo, as nanopartículas internalizadas podem ser degradadas pelas enzimas lisossomais e não chegar ao alvo de destino. Por isso, deve se pensar em estratégias para evitar este tipo de internalização quando o alvo do tratamento não for os lisossomos (Ferreira *et al.*, 2014).

Já a endocitose mediada por caveolina ocorre através de invaginações da membrana plasmática em forma de frasco com tamanho entre 50-100 nm, denominada cavéolas (Lajoie *et al.*, 2007). A caveolina (Cav1) faz com que a cavéola assuma sua estrutura em forma de frasco e possa envolver moléculas que se ligam em sua superfície, e a proteína dinamina realiza a constrição da membrana plasmática liberando o endossomo no citoplasma (Sahay *et al.*, 2010). Há relatos na literatura de diversos nanomateriais internalizados pela via da caveolina. Essa via tem atraído grande atenção na nanomedicina por ter sido sugerida como via de escape à degradação lisossomal (Hillaireau & Couvreur, 2009, Sahay *et al.*, 2010, Bastiani & Parton, 2010).

O processo de macropinocitose pode ser definido como a internalização de grandes quantidades de material extracelular, e é caracterizado pela movimentação da membrana plasmática induzida por uma ativação global do citoesqueleto de actina, que não requer receptores associados. Essa via envolve a transposição de grande quantidade de fluido externo através da formação de ondulações na extensão da membrana plasmática. Como consequência, as projeções citoplasmáticas se fundem a membrana como ondas, resultando em grandes vacúolos endocíticos, heterogêneos em tamanho e morfologia, chamados macropinosomos (Falcone *et al.*, 2006). Thurn *et al.* (2011) mostraram que captação celular de TiO₂-NPs em células tumorais de próstata humana ocorreu por macropinocitose, além da endocitose mediada por clatrina e caveolina.

A **Figura 1a** ilustra a endocitose mediada por clatrina, que envolve a formação de vesículas com regiões revestidas com clatrina. O trisquélion clatrina no citosol é então reciclado de volta à membrana plasmática seguido pelo movimento de materiais ingeridos desde o endossoma inicial até o endossoma tardio e finalmente se fundindo com o lisossoma para formar o híbrido de lipossoma-endossoma, onde os materiais são então degradados pelo baixo pH e ambiente rico em enzimas da vesícula endo-lisossômica. O esquema **1b** evidencia a endocitose mediada por caveolina, que envolve a internalização através de invasões enriquecidas de caveolina. A vesícula de caveolina citosólica então entrega seu conteúdo para os endossomas, para formar caveossomas e são transportados ao longo do citoesqueleto para o

retículo endoplasmático/complexo de Golgi, evitando a degradação lisossômica. Já o esquema **1c** mostra a macropinocitose, que é uma via independente de clatrina e caveolina. Envolve a formação de vesículas grandes chamadas macropinosomas, que ocorre através de protrusões de membrana plasmática conduzidas por filamentos de actina. Os conteúdos são degradados após a fusão com os compartimentos lisossômicos.

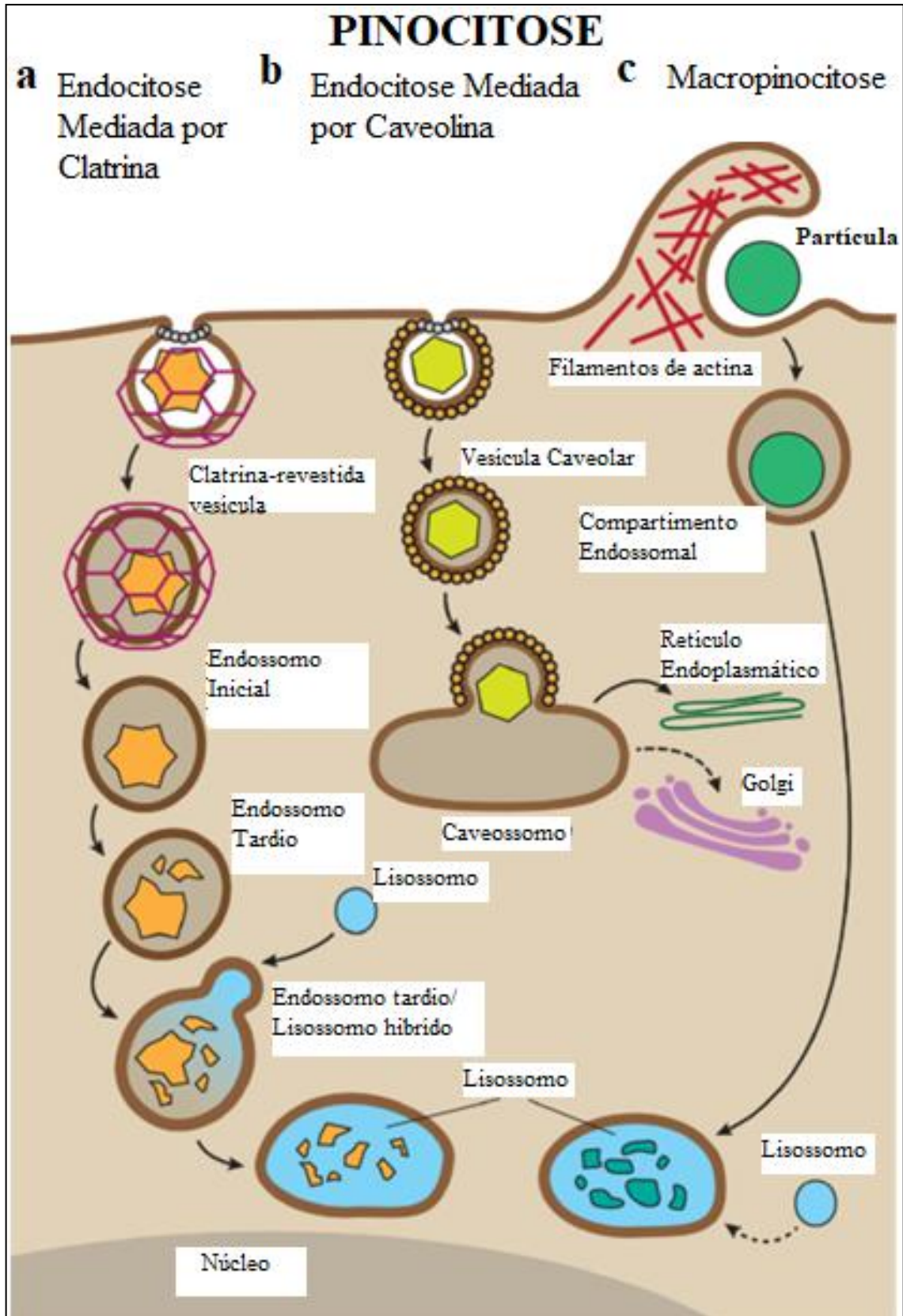


Figura 1: Uma visão geral da Pinocitose (via não-fagocítica) evidenciando os processos de endocitose mediada por a) clatrina; b) caveolina e c) macropinocitose (Figura adaptada de Stern *et al.*, 2012).

2.2.2 Endocitose de Nanopartículas de Óxido de Zinco

O processo de endocitose de ZnO-NPs envolve a internalização das nanopartículas através de endocitose mediada por receptores, seguida por hidrólise das nanopartículas através de íons de zinco dentro dos lisossomos e liberação destes íons no citosol (Taccola *et al.*, 2011, Sabella *et al.*, 2014).

Quando as ZnO-NPs são adicionadas ao meio de cultura, as partículas são revestidas por proteínas do meio. Os receptores da superfície celular se ligam nas proteínas adsorvidas nas nanopartículas e então elas entram nas células através da endocitose mediada por receptores. Quando as endossomos contendo nanopartículas se fundem com os lisossomos, o pH cai drasticamente, aproximando-se de 5. Os íons de zinco induzem a lise da membrana lisossômica e após são liberados para o citosol. A acumulação de íons de zinco no citosol desencadeia caminhos que, em última instância, causam a morte celular (Taccola *et al.*, 2011). Xia *et al.*, (2008) demonstraram que a dissociação do óxido de zinco interrompe a homeostase celular do zinco, levando ao dano lisossômico e mitocondrial e, em última instância, a morte celular ao inibir a respiração celular através da interferência com o citocromo bc1 no complexo III e com α -cetoglutarato desidrogenase.

Alguns estudos na literatura também apontam que as nanopartículas podem ser degradadas em compartimentos celulares conhecidos como autofagolisossomos em um processo conhecido como autofagia que pode desempenhar um papel importante na toxicidade destes materiais (Stern *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Loos *et al.*, 2014; Mihai *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2017; Arakha *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

2.3 Autofagia

Autofagia é um processo caracterizado pela auto-degradação de constituintes celulares, como proteínas e organelas envelhecidas ou danificadas (Mizushima *et al.*, 2008). O termo “autofagia” deriva do grego e significa “comer a si mesmo” e foi descrito pela primeira vez há mais de 40 anos, por Christian de Duve, sendo largamente baseado na degradação de estruturas intracelulares dentro dos lisossomos (Deter *et al.*, 1967). Já foram identificados 32 genes diferentes relacionados a autofagia em leveduras, e muitos destes genes estão conservados em plantas, insetos e mamíferos (Nakatogawa *et al.*, 2009).

O processo autofágico ocorre em níveis basais para manter a homeostase e o controle de qualidade citoplasmática, exercendo uma série de funções vitais, como a manutenção dos aminoácidos durante a fome, prevenção de neurodegeneração, anti-envelhecimento, supressão tumoral, proteção contra microrganismos intracelulares, e regulação de alterações inatas e imunidade (Mizushima *et al.*, 2008). A autofagia também pode ocorrer em caso de estresse devido a inanição, depleção de fatores de crescimento, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo e infecção (He & Klionsky, 2009).

O processo de autofagia está representado na **Figura 2**. O mesmo inicia-se com uma membrana de isolamento, conhecida como fagóforo, que pode ser originada do retículo endoplasmático (Axe *et al.*, 2008; Simonsen *et al.*, 2009). A fusão das extremidades do fagóforo origina uma estrutura fechada com membrana dupla chamada de autofagossomo. O autofagossomo funde-se com o lisossomo, originando o autofagolisossomo, promovendo com enzimas lisossomais a degradação dos conteúdos autofagossômicos. As macromoléculas resultantes deste processo de clivagem são transportadas de volta para o citosol para sua reutilização (Mizushima, 2007). Assim, a autofagia pode ser considerada uma "fábrica de reciclagem" celular, que também promove a eficiência energética através da geração de ATP e mede o controle de danos removendo proteínas não funcionais e organelas danificadas. Este processo geralmente é considerado um mecanismo de sobrevivência, mas sua desregulação pode induzir a morte celular não apoptótica (Glick *et al.*, 2010).

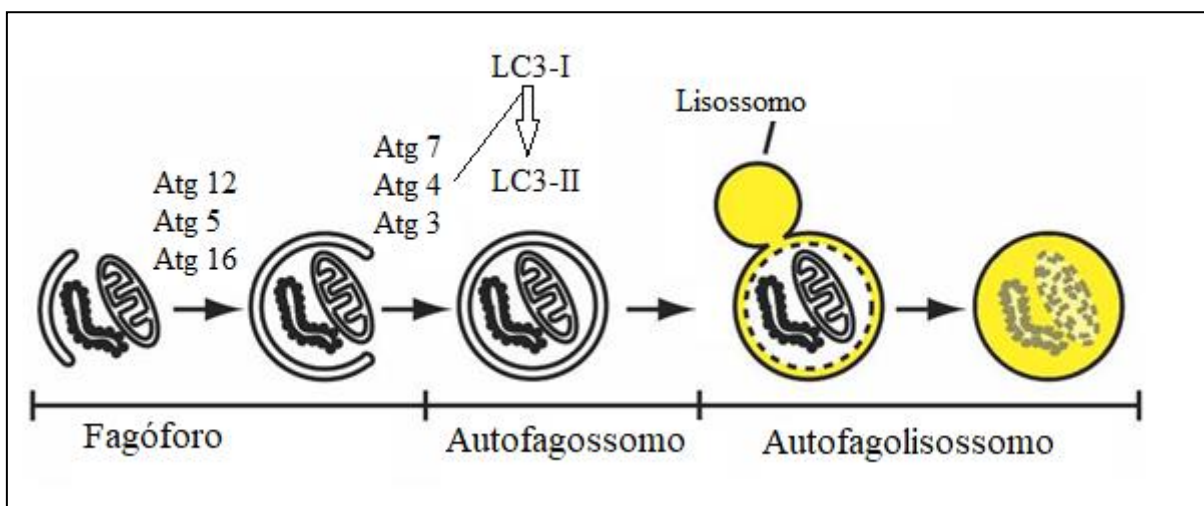


Figura 2: Visão geral da autofagia evidenciando as fases iniciais do processo de formação do fagóforo e posterior formação do autofagossomo e autofagolisossomo (Figura adaptada de Noboru Mizushima, 2007).

As fases da autofagia envolvem a atividade das proteínas Atg, que são modificadas pelos genes *Autophagy-related genes* (ATG). A formação de autofagossomos inicia com a formação da membrana, seguindo pelo seu alongamento e maturação do autofagossomo (Yang & Klionsky, 2010). Em mamíferos, o início do autofagossomo depende de proteínas quinase contendo a proteína Ulk1 e outras proteínas, como Atg13 e FIP200. Atg13 liga-se à Ulk1 e media sua interação com FIP200. Esse complexo se desloca até a membrana isolada que dará origem ao fagóforo (Ravikumar *et al.*, 2010).

A proteína PI3KIII (fosfatodilinositol-3-quinase classe III), que se encontra ligada com a proteína Beclina-1, produz a molécula lipídica crucial no início da nucleação do fagóforo, chamada PIP3 (fosfatodilinositol-3-fosfato) (Ravikumar *et al.*, 2010; Alers *et al.*, 2012). O processo de alongamento da membrana do fagóforo envolve a proteína Atg5, que conjuga-se com Atg12, que se ligam com Atg16L, formando um complexo que é recrutado até o fagóforo (Li *et al.*, 2012).

Em seguida, a proteína MAP1-LC3 (*protein microtubule-associated protein 1 light chain 3*) ou LC3, sofre clivagem pela protease Atg4B resultando na isoformacitosólica LC3-I (Hemelaar *et al.*, 2003). Em seguida, LC3-I é conjugada a fosfatiletanolamida em uma reação envolvendo Atg7 e Atg3 para formar LC3-II (Kabeya *et al.*, 2000). Finalmente, LC3II se une à membrana do fagóforo, auxiliando na expansão da membrana do autofagossomo, permanecendo ligada as membranas interna e externa do autofagossomo até sua completa formação. A proteína LC3-II é utilizada como marcador principal para verificação da ocorrência do processo autofágico (Klionsky *et al.*, 2012), porém, estudos mostram que na análise *western blot*, a expressão de LC3-II não é aumentada significativamente em um fluxo equilibrado de autofagia.

No final do processo, o autofagossomo se funde com o lisossomo, formando o autofagolisossomo, a porção de LC3-II presente na membrana interna é degradada no autolisossomo, e a externa é modulada por Atg4 e reciclada. Os produtos resultantes desta degradação, especialmente aminoácidos, são então transportados de volta para o citosol para reutilização (Mizushima *et al.*, 2011).

2.3.1 Autofagia e câncer

Na literatura, o papel da autofagia no câncer é controverso e complexo (Mizushima, 2007; Levy *et al.*, 2017). Por um lado, o processo autofágico pode suprimir o início e o

desenvolvimento de tumores ao eliminar organelas danificadas, evitando o acúmulo de produtos tóxicos que podem causar a instabilidade do genoma. Por exemplo, de acordo com o estudo de Liang *et al.* (1999), em uma alta porcentagem de câncer humano (câncer de mama, ovário e próstata), o gene Beclin-1 tem sua expressão diminuída. Yue *et al.* (2003), também relacionou o silenciamento de Beclin-1 com o aumento da tumorigênese em ratos, causando câncer de pulmão, fígado e linfoma. No entanto, por outro lado, a autofagia pode ajudar a sobrevivência de tumores estabelecidos, fornecendo nutrientes para células tumorais que estão em condições de hipoxia e privação de nutrientes, protegendo o tumor contra a apoptose induzida por medicamentos (Brech *et al.*, 2009; Giuliani & Dass, 2013).

Diante desses fatos, Levy *et al.* (2017) questionaram qual a melhor intervenção clínica no câncer, pois tanto a indução como a inibição da autofagia foram sugeridas como estratégias terapêuticas (Levy & Thorburn, 2011, Towers *et al.*, 2013).

Há muitas sugestões na literatura sobre a citotoxicidade *in vitro* das ZnO-NPs, relacionados a processos autofágicos. Atualmente, o paradigma mais amplamente aceito de toxicidade nanomaterial é o estresse oxidativo, mas os mecanismos subjacentes ainda não estão bem delimitados (Stern *et al.*, 2012). Sobre a morte celular, há evidências de apoptose, autofagia hiperestimulada, disfunção autofágica pela acumulação de autofagossomos e disfunção dos lisossomos, gerando opiniões controversas (Stern *et al.*, 2012, Roy *et al.*, 2014; Cohignac *et al.*, 2014, Akhtar *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2017).

Em estudos diferentes, ambos utilizando células de câncer de fígado humano (HepG2) tratadas com ZnO-NPs, Akhtar *et al.* (2012) e Sharma *et al.* (2012), concluíram que o mecanismo de morte celular envolvido foi a apoptose. No trabalho de Bai *et al.* (2017), utilizando células de câncer de ovário humano (SKOV3), foi sugerido dois mecanismos de morte celular, autofagia e apoptose. Arakha *et al.* (2017), utilizando linhagem celular de fibrosarcoma relataram que as células tentaram se recuperar do estresse por remoção de biomoléculas celulares danificadas utilizando autofagossomos, porém, células com danos não recuperáveis sofreram morte celular apoptótica. Loss *et al.* (2014) e Cho *et al.* (2014) também relatam que a disfunção lisossômica pode levar à autofagia incompleta causando a morte celular. Zhang *et al.* (2017) mostraram que a dissolução de íons intracelulares de zinco nos lisossomos, causou um fluxo autofágico prejudicado em células epiteliais pulmonares, levando a morte celular. Zhang *et al.* (2017) ressaltam que ZnO-NPs podem ser dissolvidos em lisossomos causando disfunção lisossômica, porém o mecanismo regulatório e efeito biológico da disfunção lisossômica permanecem pouco esclarecidos.

2.4 Breves considerações sobre o câncer

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças (INCA,2017a) que tem em comum um processo composto de várias etapas na qual uma célula adquire sucessivas mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (WHO, 2017). Tais processos resultam em células que proliferam descontroladamente em comparação com células não tumorais (Swartz *et al.*, 2012). Em geral, as células cancerosas surgem como consequência da desregulamentação de múltiplos fatores, como mutações somáticas e herdadas e alterações epigenéticas (Hanahan & Weinberg, 2011, Berardi & Fantin, 2012).

A estimativa da GLOBOCAN, realizada em 2012, prevê um aumento de 70% nas próximas décadas nos números de novos casos de câncer no mundo e 21,4 milhões de novos pacientes até 2032. Em 2012 eram 14,1 milhões. No Brasil, para os anos de 2016 e 2017 foram 600 mil casos de câncer. O câncer de pele não melanoma foi o de maior incidência para homens e mulheres. O segundo câncer mais incidente em mulheres foi o de mama, seguido por cólon e reto, colo de útero, pulmão e estômago. Já para homens, o foi de próstata, seguido por pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral (INCA, 2017b).

Problemas na capacidade de administrar drogas terapêuticas que alcancem seletivamente o alvo desejado, sem danos colaterais, são um dos principais desafios no tratamento do câncer (Langer, 1998; Duncan, 2003, Vieira & Gamarra, 2016).

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (INCA, 2017b).

Em nível molecular, o câncer colorretal é um grupo muito heterogêneo de doenças com cerca de 30% dos casos hereditários ou familiares. Os cânceres colorretais esporádicos (CRCs), devido a mutações somáticas, representam cerca de 70% de todos os CRCs. Durante o desenvolvimento de adenocarcinomas colorretais, as células epiteliais de traço gastrointestinal adquirem mutações genéticas e epigenéticas sequenciais em oncogenes específicos e/ou genes supressores de tumores, causando o aparecimento de CRC, progressão e metástase. Alterações como instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélite, metilação aberrante de DNA e defeitos nos mecanismos de reparo de dano de DNA apresentam papel importante no câncer colorretal (De Rosa *et al.*, 2005).

O número de casos novos de câncer de cólon e reto para o Brasil em 2016 foi de 16,660 casos em homens e de 17,620 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste

e terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste. Nas regiões Nordeste e Norte, ocupa a quarta posição. Para as mulheres é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul. Nas regiões, Centro-Oeste, Nordeste e na região Norte é o terceiro mais frequente (INCA, 2017b). No mundo, o câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum e uma das principais causas de morte por câncer (GLOBOCAN, 2012).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as características físico-químicas de nanopartículas de óxido de zinco e alterações morfológicas e funcionais relacionadas à autofagia em linhagem de câncer colorretal expostas a ZnO-NPs.

3.1 Objetivos específicos

- caracterizar as ZnO-NPs com relação ao tamanho, dimensão e aspectos da superfície, utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Difração de Raios X;
- caracterizar e avaliar a dinâmica das ZnO-NPs dispersas em meio de cultura DMEM, utilizando as técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta;
- avaliar os efeitos citotóxicos de ZnO-NPs na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116 utilizando o ensaio MTT;
- avaliar os efeitos na formação de colônias da linhagem de carcinoma colorretal tratadas com ZnO-NPs;
- analisar alterações na morfologia das células de carcinoma após exposição às ZnO-NPs, usando microscopia de contraste de fase;
- avaliar a expressão da proteína de marcação autofágica LC3 A/B em células de carcinoma colorretal tratadas com ZnO-NPs, utilizando *western blot*;
- confirmar a expressão da proteína LC3 A/B em células de carcinoma colorretal tratadas com ZnO-NPs, utilizando imunofluorescência indireta.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico.

4.1 Capítulo I

Zinc Oxide Nanoparticles induces autophagy in Human colon carcinoma cells

Camila Custódio Leite¹, Francine Girardello¹, Andreia Neves Fernandes², Caroline Menti¹, João Antonio Pêgas Henriques¹, Mariana Roesch-Ely^{1}*

¹Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

²Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15003, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Address: Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Tel: +55-54-3218-2100; fax: +55-54-3218-2664. E-mail address: mrely@ucs.br (M. Roesch-Ely).

ABSTRACT

Here, the cytotoxic effects of ZnO-NPs on human colon carcinoma cells (HCT-116) and induction of autophagy was investigated. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was used to evaluate cell toxicity and clonogenic test to evaluate colony formation after ZnO-NPs exposure. Alterations in cell morphology was monitored under an inverted light microscope using phase contrast staining in the presence of increase concentrations of ZnO-NPs and immunofluorescence and western blot performed to investigate autophagy. The commercially acquired ZnO-NPs were previously characterized, confirming their crystalline structure by the X-ray Diffraction technique and its approximate size of 50 nm by Transmission Microscopy. The solutions of 15 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ZnO-NPs showed low stability with tendency to aggregate revealed by the Zeta Potential. HCT-116 Cells were treated with different concentrations of ZnO-NPs (0-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MTT and 0-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for clonogenic assay). A significant reduction in cell viability revealed by the MTT assay was observed after 24, 48 and 72h ZnO-NPs exposure, with IC₅₀ of 23,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 23,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 21,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The clonogenic assay confirmed MTT results once colony formation was affected progressively with increase of ZnO-NPs concentration, with slightly reduced IC₅₀ compared to MTT, of IC₅₀ 14,313 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 13,065 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 11,459 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Morphological changes in cells such as loss of adhesion and retraction of the cytoplasm were observed under an inverted light microscope using phase contrast after increase concentrations of ZnO-NP. Expression of the LC3 A/B protein was analyzed by Western Blot, revealing a progressive increase of its expression after 6, 12 and 18h of incubation with the IC₅₀, patterns confirmed by indirect immunofluorescence assay, which revealed similar increase in LC3 A/B (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) expression pattern compared to positive control of autophagy Rapamycin (100nM). The results here presented that ZnO-NPs were able to promote cytotoxic effects on HCT-116 human colon carcinoma cell lines and induce autophagy at concentration of 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results are in agreement with the literature, in which autophagy was described as a process of activated cell signaling in different cell models after exposure of ZnO-NPs. Due to the lack of studies indicating the mechanism of action after exposure to ZnO-NPs in colorectal cancer cells, the data here presented may contribute to the elucidation of the effects of nanoparticles on tumor cells and may direct further studies to better understand the role of autophagy induced by ZnO-NPs.

Keywords: nanotechnology, zinc oxide, colorectal cancer, antitumoral, autophagy

Introduction

Colorectal cancer is highly prevalent throughout the world, with significant morbidity and mortality. Despite improvements in treatments involving chemotherapy, drug resistance and side effects remain a major challenge (Cisterna *et al.*, 2016). In exploring new strategies for the treatment of cancer, one possibility is the development of nanomedicine, which represents a revolutionary area of science with innovative promises due to the ability to produce nanomaterials in a controlled manner with unique physical and chemical properties, reducing the dose required and the side effects that are the principal disadvantage of such drugs (Vinardell & Mitjans, 2015, Bisht & Rayamajhi, 2016).

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) are frequently used in industrial products such as paint, surface coating and cosmetics and have recently been exploited in biomedical applications due to their biocompatibility, effective cytotoxicity, easy synthesis, low cost, photocatalytic properties and promotion of reactive oxygen species generation, may be a promising anticancer agent (Rasmussen *et al.*, 2010, Bisht & Rayamajhi, 2016). Decreased cell viability in tumor cell lines after exposure to ZnO-NPs was well described in many studies. For example, Ahamed *et al.*, 2011 reported a decrease in cell survival in human alveolar adenocarcinoma cells, Yuan *et al.*, 2014, in human liver carcinoma cells using low doses of ZnO-NPs and more recently Chakraborti *et al.*, 2017, using breast cancer cell. Oxidative stress has been reported as one of the cellular metabolic responses in inducing ZnO-NPs cytotoxicity, leading to death processes as apoptosis and autophagy (Ahamed *et al.*, 2011, Pandurangan *et al.*, 2016, Bai *et al.*, 2017).

Autophagy involves a lysosomal degradation process with several steps, in which cells degrade aged or damaged proteins and organelles (Mizushima *et al.*, 2008, Glick *et al.*, 2010). The role of autophagy in cancer is controversial because the process may suppress early tumor development by deleting damaged organelles in normal cells or may help tumor cell survival by protecting the tumor against drug-induced apoptosis (Brech *et al.*, 2009; Giuliani & Dass, 2013). The autophagy associated with the induction of cell death in tumor cells treated with ZnO-NP has been described in human ovarian cancer (Bai *et al.*, 2017), lung epithelial cells (Zhang *et al.*, 2017) and fibrosarcoma cells (Arakha *et al.*, 2017). Autophagy is involved in a complex cell response regulated by several mediators. One of them, the LC3A/B complex, has been investigated recently as part of steps of the autophagy process (Mizushima *et al.*, 2011). In order to better elucidate mechanisms of action related to

autophagy processes after cell exposure to nanoparticles the cytotoxic effects of ZnO-NPs on human colon carcinoma cells and induction of autophagy was investigated.

Material and Methods

Zinc Oxide Nanoparticles

Commercial ZnO-NPs were purchased from Sigma-Aldrich and the stock solution was prepared by suspending the ZnO-NP powder in Milli-Q water at a concentration of 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Prior to the assays, the stock solution was sonicated for 30 min and then the dilutions in DMEM medium of the different concentrations were prepared administration to the cells and physico-chemical characterization.

Analysis Trough TEM, XRD, Zeta Potential and DLS

The average dimensions, shape and morphology of ZnO-NPs powder were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEM JEOL 1200 Ex II, operating at 80 kV, equipped with a CCD camera. The crystalline phase of ZnO-NPs was analyzed by X-ray diffraction (XRD) using the Siemens D500 X-Ray Diffractometer and performed in the 2θ range from 20 to 80 with a step size of 0,05, using $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406$) radiation. Dynamic light scattering (DLS) was performed with a Brookhaven Instruments EMI 9863 equipped with a 35 mW He-Ne laser, 632,8 nm laser diode. The Zeta potencial (ZP) measurement was carried out on a Zeta Potencial Analyzer Brookhaven Instruments ($\lambda = 660\text{nm}$) 31,450. The 15 e 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ZnO-NPs solutions were freshly prepared to evaluate the hydrodynamic size distribution by DLS, the electric charge and stability of dispersion by ZP analysis.

Cell Culture and Survival Analysis After Exposure to ZnO-NPs

Colorectal carcinoma cells (HCT-116) cells was obtained by the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% (w/v) heat-inactivated FBS and 1% (w/v) penicillin–streptomycin. The cultures were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO_2 and 95% air. The study was performed as cells reached 70–80% confluence.

Cell viability was measured using the (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium assay (MTT) (Mosmann, 1983). Briefly, cells were seeded into the 96-well plates at a density of 5×10^4 cells/mL. After 24 h, cells were treated with different concentrations (0, 10, 15, 20 and $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) of ZnO-NPs and incubated for 24 h, 48 h and 72 h. Negative controls treated with the same amounts of H₂O Milli-Q solvent. The medium was removed and 1 mg/mL MTT dye in serum-free medium was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 2 h in humidified 5% CO₂ atmosphere. Subsequently, the MTT solution was removed and the obtained formazan violet product was dissolved in 100 μL DMSO. Absorbance was measured using a microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) at 570 nm. All readings were compared with the control, which represented 100% viability. The IC₅₀ (concentration $\mu\text{g/mL}$ that inhibits cell growth by 50%) ratio of cancerous cell was also calculated.

Clonogenic Assay

Colorectal carcinoma cells (HCT-116) were seeded in a 6-well plate at a density of 2×10^2 cells/well and treated with 0, 5, 10, 15 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ZnO-NPs. After 24, 48 and 72h of tratament, cells were washed with PBS, and supplemented medium was added to wells for 7 days. Subsequently, the medium was removed, and cells were fixed for 5 min with 2 mL of methanol then rinsed with water. Cell colonies were stained for 10 min in 2 ml of 1% crystal violet solution, washed once again with water, and then counted.

Morphological Evaluation

Colorectal carcinoma cells (HCT-116) were seeded into 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/mL. After 24 h incubation, the cells were treated with different concentrations (0, 10, 15, 20 and $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) of ZnO-NPs and incubated for 24 h. Negative controls treated with the same amounts of H₂O Milli-Q solvent. Morphological changes of the cells were observed and photographed under a inverted light microscope using phase-contrast (Nikon®).

Western Blotting Analysis

To evaluate the expression levels of LC3A/B protein related to autophagy, colorectal carcinoma cells (HCT-116) cells were exposed with IC50 of ZnO-NPs for 6h, 12h, and 18h. For the isolation of total protein fractions, the cells were collected, washed twice with ice-cold PBS, and lysed using cell lysis buffer [NP40, 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA, protease inhibitor]. The lysates were collected by scraping from the plates and then centrifuged at 10000 rpm at 4 °C for 5 min. Total protein samples were loaded on a 12% of SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) for 1 h. Membranes were blocked at room temperature for 1 h with blocking solution (5% power milk in TBST). Next, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with anti-human LC3A/B rabbit mAb (1:1000 dilution; Cell Signalling), and anti-human GPDH mouse mAb (1:5000 dilution, Cell Signaling). After washing, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-mouse Ig. Immuno blots were performed using ECL prime. Western blotting detection kit (Amersham). Chemiluminescence visualization and detection was performed using ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare life sciences).

Indirect Immunofluorescence Assay

Colorectal carcinoma cells (HCT-116) cells were seeded into 24-well plates containing coverslips. After 24 h incubation, cells were treated with a range of different concentrations (0-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ZnO-NPs and incubated for 24h. Negative controls treated with the same amounts of H₂O Milli-Q solvent. Positive control received Rapamycin (100nM). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, blocked with 2% BSA for 1h, and incubated with the primary antibody, monoclonal anti-LC3A/B antibody (Cell Signaling, 1:100 v/v) for 1h, followed by incubation with secondary anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (Anti-mouse IgG, Sigma, 1:150 v/v) for 1h. The slides mounted with coverslip and analyzed with a fluorescence light microscope (BX43 – Olympus).

Statistical Analyses

The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate, used to assess normal distribution data. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Tukey post-hoc test. Statistical significant of mean differences was accepted at a level of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software (version 23.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Characterization of ZnO-NP through TEM, XRD, Zeta Potential and DLS

ZnO-NPs were analyzed through TEM showing average size of about 50 nm (**Figure 1**), which is in accordance to declared size by the manufacturer. **Figure 2** presents the X-Ray diffraction pattern that revealed the presence of wurtzite phase, with high diffraction peak with 2θ values of 32.41° , 34.24° , 36.14° , 47.35° , 56.39° , 62.56° , and 66.94° , typical of ZnO hexagonal crystals (Dantas *et al.*, 2008, Saraswathi *et al.*, 2017).

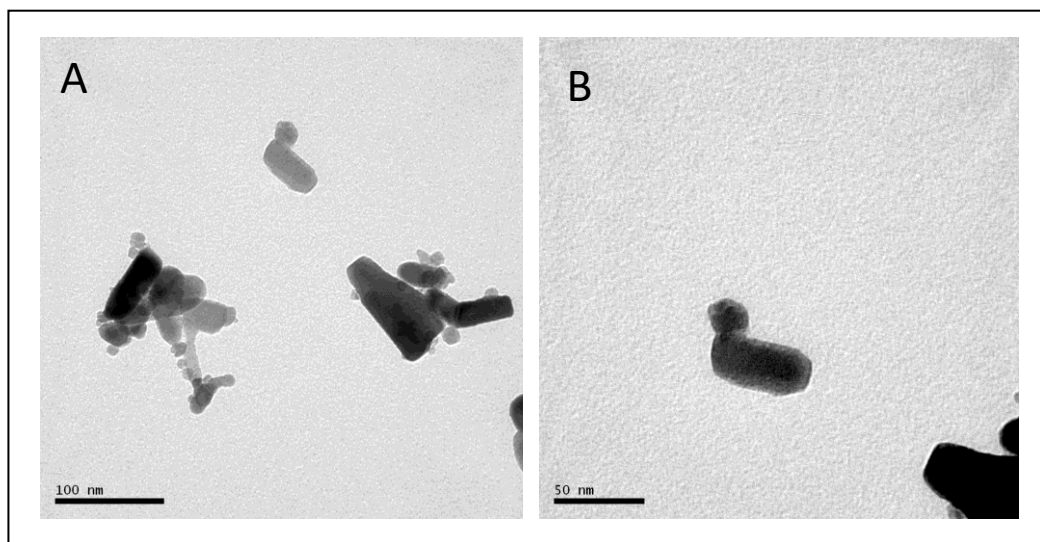


Figure 1. Transmission Electron Microscopy images of ZnO-NP powder in lower (A) and higher (B) magnification. Media dimension of nanoparticles are of about 50 nm.

Zeta Potential was employed to evaluate the stability of nanoparticles in aqueous solution, estimating the particle surface potential that is related to the nanoparticles

agglomerated rate. The average zeta potential was calculated and presented values from -38.72 ± 4.58 mV for the control, -8.54 ± 14.31 to -2.8 ± 12.81 mV for ZnO-NP solutions and 21.99 ± 1.21 mV for the stock solution in ultra-pure water (**Frame 1**). DLS analysis revealed a decrease in the hydrodynamic size of the particles compared to the control medium. The control group was composed of DMEM presented a size of $140.6 \text{ nm} \pm 42$ nm. The lowest concentration at $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ presented a size of $6.3 \text{ nm} \pm 12$ and the highest concentration at $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ showed the hydrodynamic size of $79.8 \text{ nm} \pm 15$.

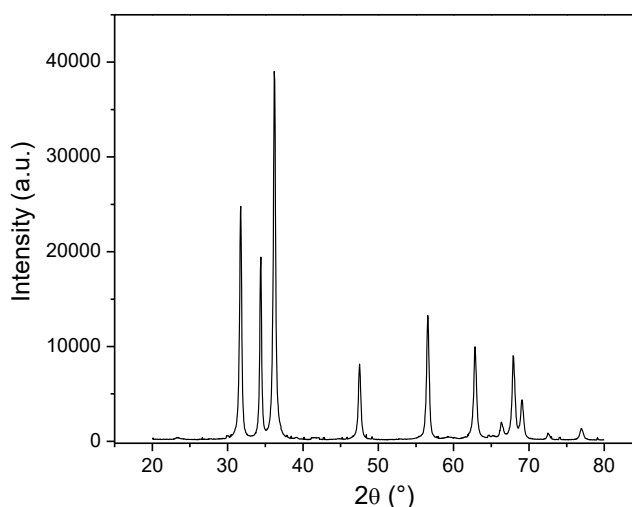


Figure 2. X-Ray diffraction (XRD) pattern of ZnO-NP. The crystalline wurtzite phase is represented in arrows.

Frame 1. Physical-chemical parameters of solutions in different ZnO-NP concentrations.

ZnO-NP concentration	Average Zeta Potential (mV)	DLS (nm)
Control	-38.72 ± 4.58	140.6 ± 42
$15 \mu\text{g mL}^{-1}$	-8.54 ± 14.31	64.3 ± 12
$25 \mu\text{g mL}^{-1}$	-2.8 ± 12.81	79.8 ± 15
$1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (H ₂ O Milli-Q)	21.99 ± 1.21	Equipment capacity exceeded

Viability assay

The MTT results demonstrated a concentration-dependent cytotoxicity after exposure to ZnO-NPs. The MTT reduction (relative to control) of HCT116 cells observed after ZnO

exposure at concentrations 10, 15, 20 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 24, 48 and 72h, showed IC50 of 23.86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 23.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 21.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (**Figure 3**).

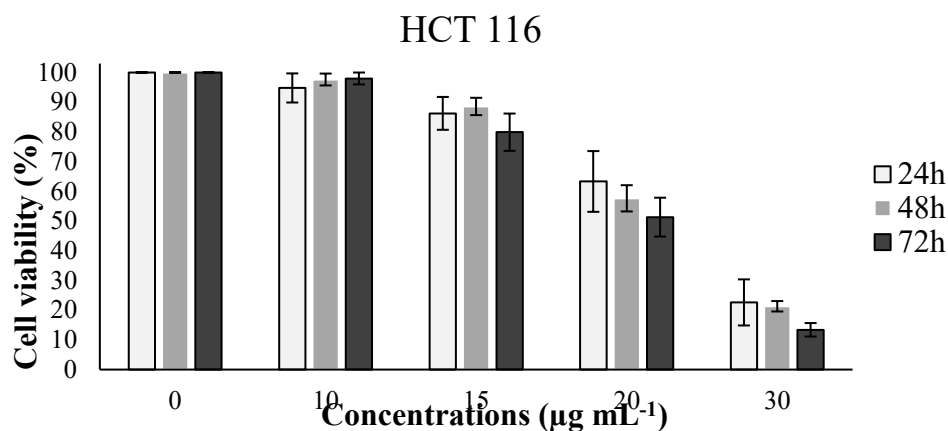


Figure 3. Cell viability (MTT assay) of human colon carcinoma (HCT-116) exposed to different concentrations of ZnO-NPs for 24, 48 and 72h. Data are of mean \pm SD of triplicate values.

Clonogenic Assay

The clonogenic survival assay was performed to determine the ability of HCT116 cells to proliferate and form colonies in the presence of 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ZnO-NPs for 24, 48 and 72h. ZnO-NPs reduced the number of colony formation of colorectal cancer cells compared to control, with IC50 14.313 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 13.065 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 11.459 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (**Figure 4**). Although the clonogenic test revealed reduced IC50 values compared to MTT test, a similar pattern of reduction in cell proliferation was observed after exposure to increased concentrations of ZnO-NPs.

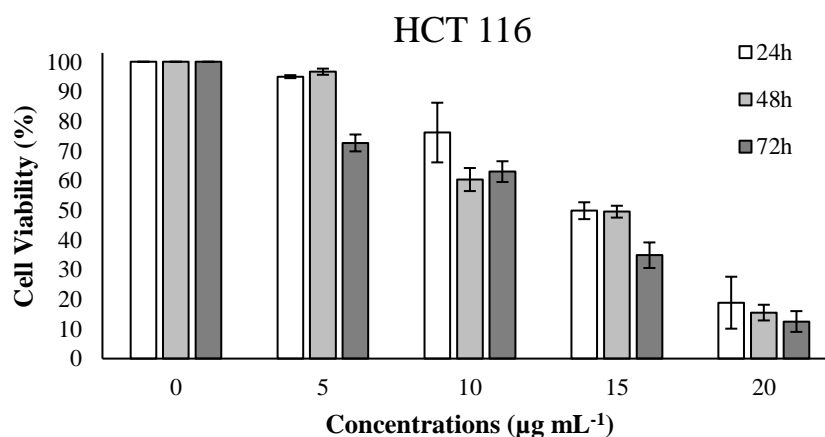


Figure 4. Colony forming ability of HCT116 cells treated for 24, 48 and 72h with ZnO-NPs.

Morphological Assay

The morphology of human colorectal cancer cells was monitored after ZnO-NP exposure through phase contrast microscopy. A significant reduction in cell density, cytoplasmic retraction and loss of adherence were evident at concentrations above $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ZnO-NP, after 24h exposure, compared to the control group (**Figure 5**).

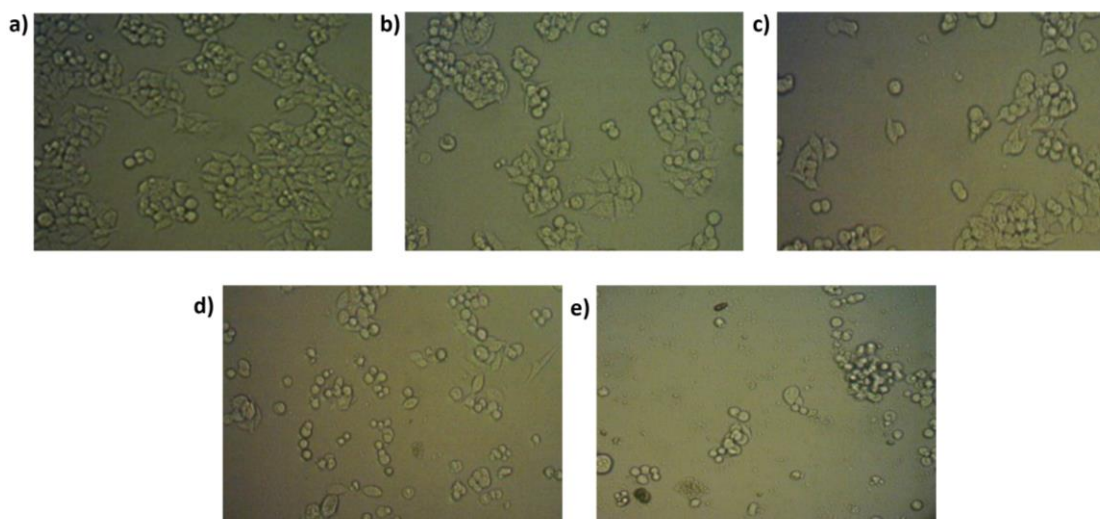


Figure 5. Morphological analysis of human colorectal cancer cells after increase concentrations of ZnO-NP monitored through phase contrast microscopy. a) Control; b) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; c) $15 \mu\text{g mL}^{-1}$; d) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ and e) $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Western Blot and Indirect Immunofluorescence Analysis

LC3A/B protein expression was monitored through western blot technique after 6h, 12h and 18h ZnO-NP exposition compared to GPDH using concentrations of IC50 against human colorectal cancer cells. A progressive increase in LC3A/B protein expression could be observed after different incubation times. (**Figure 6**).

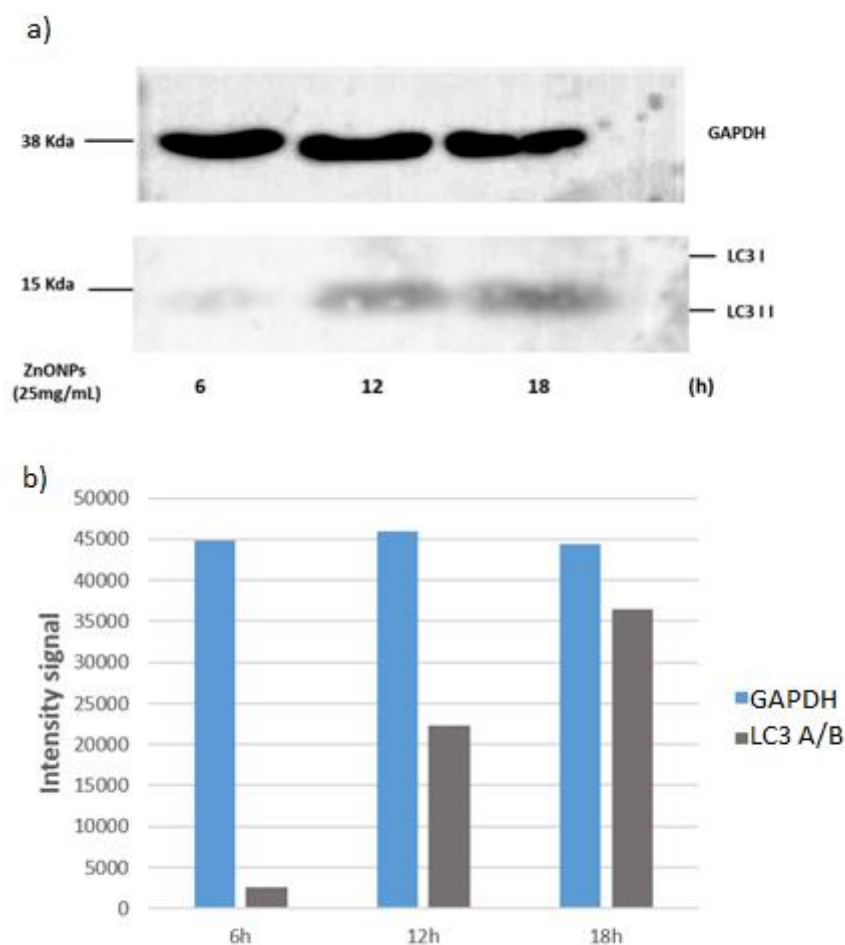


Figure 6. Increase in LC3A/B expression compared to GPDH in human colorectal cancer cells with IC50 after different incubation time (6h, 12h, 18h) expositions to ZnO-NPs. a) western blot image and b) intensity signal taken from Image J software.

These results are confirmed with the immunofluorescence assays, where expression of LC3A/B was enhanced with green fluorescence after $25\mu\text{g mL}^{-1}$ ZnO-NP exposure. Note that positive control with Rapamycin (100nM) was used and LC3A/B protein expression presented a similar pattern to the ZnO-NP IC50 concentration (**Figure 7**). The topographic distribution by indirect immunofluorescence revealed that cells exposed to different concentrations of ZnO-NPs progressively increased the expression for LC3 A/B. The highest concentration showed fluorescence marking similar to the positive control for autophagy using Rapamycin at 100nM, with affinity in autophagosomes of cell structures. A schematic plot in **Figure 8** is highlighting possible mechanism of endocytosis and autophagy of ZnO-NPs.

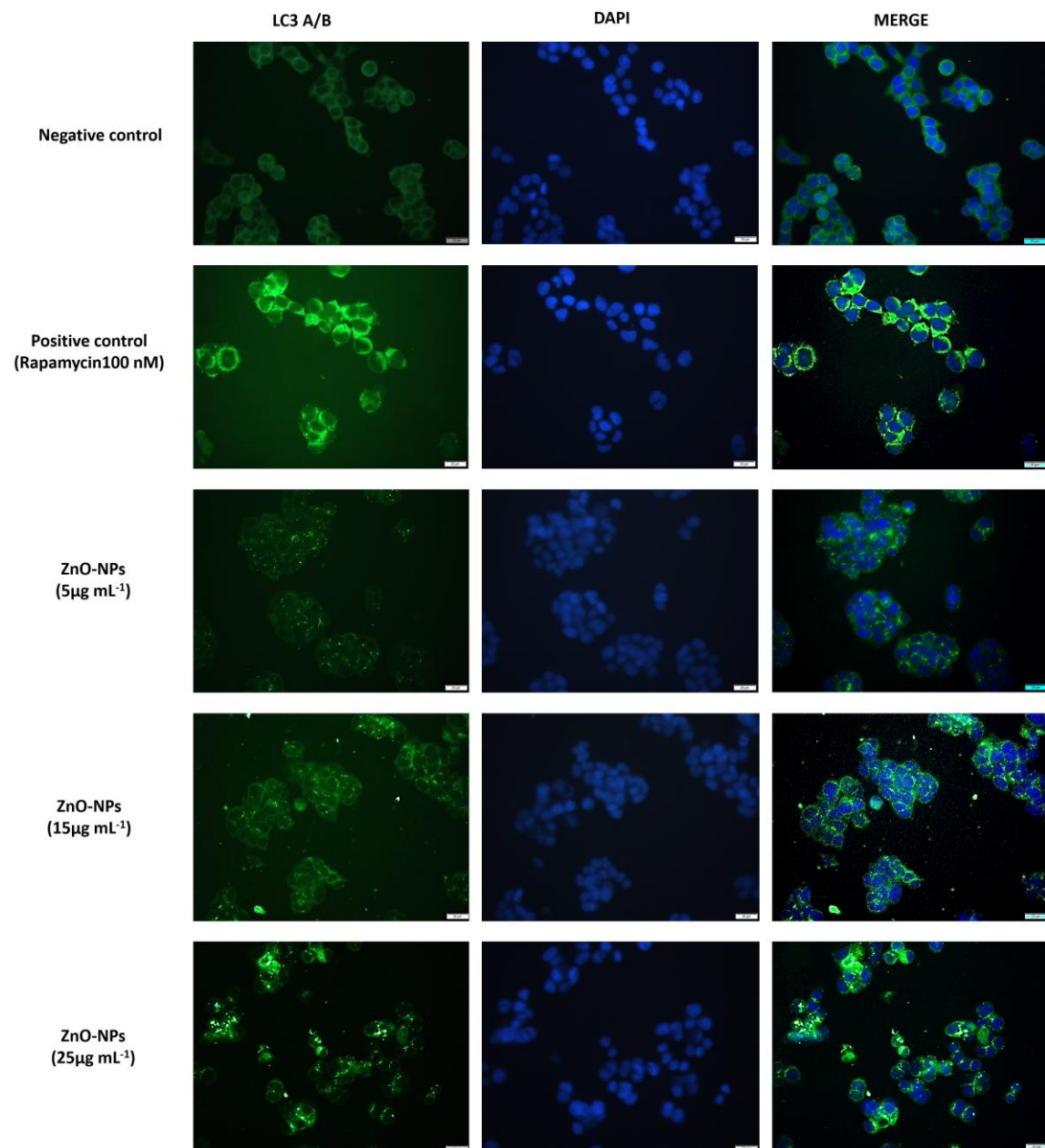


Figure 7. Increase in LC3A/B expression pattern in human colorectal cancer cells after exposure to a range of ZnO-NP concentration (0-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Note that positive control with Rapamycin (100nM) showing similar expression pattern compared to the higher concentration (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ZnO-NP. Negative control (without ZnO-NP) is also represented in first line.

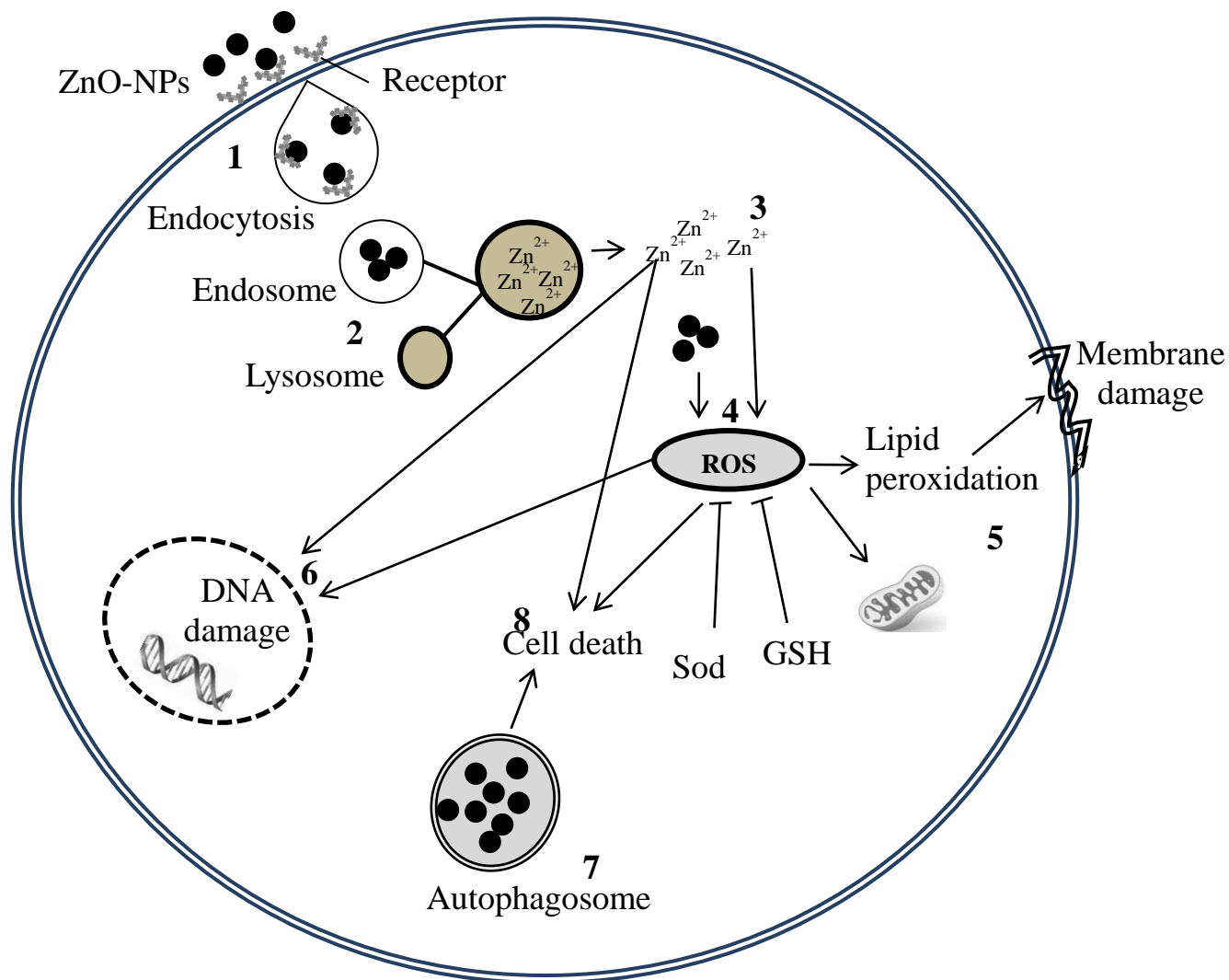


Figure 8. Schematic plot highlighting possible mechanism of endocytosis and autophagy of ZnO-NPs. ZnO-NPs can be internalized through receptor-mediated endocytosis (1), followed by the fusion of the endosome with the lysosome where ZnO-NPs (2) degradation and Zn²⁺ release of the ions into the cytosol (3). In the cytosol, Zn²⁺ and ZnO-NPs can cause oxidative stress by generating ROS (4), damaging cellular organelles, the cell membrane through lipid peroxidation (5) and causing DNA damage (6). ZnO-NPs also induce autophagy and be internalized in autophagosomes (7). Damage to cell organelles and hyperstimulated autophagy caused by Zn²⁺ and ZnO-NPs can lead to cell death (8). (Guan *et al.*, 2012, Sabella *et al.*, 2014, Ray *et al.*, 2014, Mihai *et al.*, 2015, Taccola *et al.*, 2011, Girardello *et al.*, 2016).

Discussion

Numerous reports point out cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in different cell models. The effects are dependent cellular model, nanomaterial size, on the concentration and exposure time of the ZnO-NPs. The identification of the wurtzite crystal structure by the X-ray diffraction technique, together with the transmission electron microscopy analysis, which allowed to observe the shape and dimensions of ZnO-NPs, corresponding to

approximately 50 nm, are in agreement with the characteristics of the ZnO-NPs used by Guan *et al.*, (2012), which also induced concentration-dependent cytotoxicity in human hepatocyte and human embryonic kidney cells. The zeta potential analysis revealed that the ZnO-NPs dispersed in DMEM culture medium are unstable because the forces between the particles are not sufficient to avoid agglomerates in aqueous media, which was confirmed by analyzing the results obtained with DLS, since the hydrodynamic size of the ZnO-NPs in culture medium was slightly larger than the size obtained by MET. Characteristics also described by Ahamed *et al.*, (2011), where the MET analysis revealed the size of 52 nm and, at the DLS analysis, 97 nm. On the other hand, Sharma *et al.*, (2012) observed a hydrodynamic size approximately 4x larger than the MET analysis. In this context, the need of physicochemical characterization of nanomaterials is emphasized, in order to allow a better understanding of its effects in different cellular models.

In general, literature establishes that concentrations below $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ZnO-NP presented low *in vitro* toxicity. Another point that seems consensual in the literature is the time of exposure of the material to the biological medium; acute treatments have lower rates of cytotoxicity compared to chronic exposures. However, there seems to exist a concentration threshold that induces cell death such as, for example, apoptosis or autophagy. The internalization of ZnO-NPs (Figure 8) can occur through receptor-mediated endocytosis, followed by hydrolysis of the nanoparticles through zinc ions within the lysosomes and release of these ions into the cytosol (Taccola *et al.*, 2011, Sabella *et al.*, 2014) and may also be degraded in cell compartments called as autophagolysosomes in a process known as autophagy. Autophagy seems to be closely related to intracellular oxidative processes, and some authors still point to inflammatory processes such as participation in autophagy induction.

Cytotoxic effects of ZnO-NPs and regulatory mechanisms including ROS production and autophagy induction have been recently reported (Yu *et al.*, 2013; Arakha *et al.*, 2017, Roy *et al.*, 2014,). Here, cytotoxicity was evaluated by both direct clonogenic assay and indirect MTT analysis and showed similar cytotoxic profiles. Once ROS has been attributed as a major response in cell metabolism exposed to ZnO-NP, interferences in MTT could appear upon mitochondrial redox unbalance. Therefore, direct colony formation analysis in exposed and control group was performed.

ROS activation seems to be present in many reports investigating autophagy induction upon ZnO-NPs exposure. Song *et al.*, (2014) studied the effects of ZnO-NPs on the human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). The results showed that ZnO-NPs had

a highly significant dose-dependent effect on cell activity. There was an increase in ROS release, suggesting that the cytotoxicity of ZnO-NPs in intestinal cells can be mediated by oxidative stress. De Berardis *et al.*, (2010) analyzed the effects of ZnO-NPs on the human colon carcinoma line LoVo. Treatment with ZnO-NPs ($11.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h induced a significant decrease in cell viability, increase of H_2O_2 , decrease of O_2 and GSH, depolarization of internal mitochondrial membranes and apoptosis, with higher doses inducing about 98% of cytotoxicity after 24 hours of treatment. The authors also suggest oxidative stress as a key pathway in inducing the cytotoxicity of ZnO-NPs in colon carcinoma cells. Yu *et al.*, 2013, studied the induction of autophagy by ZnO-NPs in normal epidermal cells of rat skin and concluded that ZnO-NPs can lead to cell death by the accumulation of autophagic vacuoles and mitochondrial damage through ROS induction.

Most recently, Bai *et al.*, 2017, evaluated the effects of 20 nm ZnO-NPs on human ovarian cancer cells (SKOV3), concluding that these nanoparticles induced apoptosis and autophagy, due to increased generation of ROS, double-stranded DNA damage, and loss of membrane potential.

Autophagy plays an important role on cell response in metabolisms exposed to several different sorts of NP. Some studies focused on the biocompatibility of ZnO nanomaterials. ZnO-NPs have been reported to have cytotoxic effect upon increase of Zn^{2+} concentration in the culture medium or cells containing ZnO (Muller *et al.*, 2010). However, such leakage of ionic Zn^{2+} in the biological system resulting from the dissolution of ZnO can be well tolerated at lower concentrations (Xiong, 2013). Literature has pointed out that higher concentrations of ZnO-NPs are capable of inducing cells death mechanisms (Meyer *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2013). The results here presented show that concentrations of ZnO-NPs at $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ are capable of decrease cell viability, formation of colonies, alter cell morphology and autophagy inducing. In addition, until present, no studies were conducted to evaluate the effects of ZnO-NPs on HCT-116 human colon carcinoma cells.

Conclusions

The results here presented indicate that ZnO-NPs decrease cell viability and induce autophagy in the colorectal cancer strain HCT-116. Due to the lack of studies indicating ZnO-NPs induced autophagy in colorectal cancer cells, our data may contribute with new evidence on the effects of these nanoparticles and their relationship with the autophagic process in

colorectal carcinoma cells. Although further studies are needed, ZnO-NPs are possible alternative sources of oncology therapy strategies, given the urgent need to develop new classes of anticancer agents.

References

- Arakha, M., Roy, J., Nayak, P., Mallick, B., Jha, S., **2017**. Zinc oxide nanoparticle energy band gap reduction triggers the oxidative stress resulting into autophagy-mediated apoptotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 110, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.015>.
- Bai, D., Zhang, X., Zhang, G., Huang, Y., Gurunathan, S., **2017**. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*. 12, 6521–6535. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140071>. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007>.
- Bisht, G. & Rayamajhi, S., **2016**. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine*. 3, 9. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007>.
- Brech, A.; Ahlquist, T.; Lothe, R.A. E Stenmark, H., **2009**. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Molecular oncology*. 3, 366-375. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007>
- Chakraborti, S., Chakraborty, S., Saha, S., Manna, A., Banerjee, S., Adhikary, A., Sarwar, S., Hazra, KT, Das, T., Chakrabarti, P., **2017**. PEG-functionalized zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent impairment of DNA damage repair enzyme NEIL2. *Free Radical Biology and Medicine*. 103, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.048>.
- Cisterna, B.A., Kamaly, N., Choi, W., Tavakkoli, A., Farokhzad, O.C., Vilos, C., **2016**. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine (Lond.)*. 11, 2443–2456. <https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0194>.

- Dantas, N. O., Damigo, L., Qu, F., Silva, R.S., Sartoratto, P.P.C., Miranda, K.L., Vilela, E.C., Pelegrini, F., Morais, P.C., **2008**. Structural and magnetic properties of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals. *J. Non-Cryst. Solids.* 354, 4727-4729. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.04.024>.
- De Berardis, B., Civitelli, G., Condello M., Lista P., Pozzi, R., Arancia, G., Meschini S., **2010**. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 116-27. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.012>.
- Giuliani, C. M., Dass, C. R., **2013**. Autophagy and cancer: taking the toxic out of cytotoxics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 65, 777- 789. <https://doi.org/10.1111/jphp.12034>.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K., **2010**. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221, 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- Jean, M., Levy, M., Towers, C. G., Thorburn, A., **2017**. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews.* 17, 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>.
- Mizushima, N., **2007**. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861-2873. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.1599207>.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., **2008**. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451, 1069-1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>.
- Mizushima, N., Komatsu, M., **2011**. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 147, 728-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.

- Mosmann T., **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Muller, K. H., Kulkarni, J., Motskin M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J.N., Ryan M.P., Porter, A.E., **2010**. pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution. *ACS Nano.* 4, 6767-79. <https://doi.org/10.1021/nn101192z>.
- Rasmussen, J., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D., **2010**. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 7, 1063-107. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.502560>.
- Saraswathi, V. S., Tatsugi, J., Shin, P., Santhakumar, K., **2017**. Facile biosynthesis, characterization, and solar assisted photocatalytic effect of ZnO nanoparticles mediated by leaves of *L. speciosa*). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* 167, 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.032>.
- Song, Y., Guana, R., Lyub, F., Kanga, T., Wua, Y., Chen, X., **2014**. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutation Research.* 769, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.08.001>
- Thevenot, P.; Cho, J.; Wavhal, D.; Timmons, R.B.; Tang, L., **2008**. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine.* 4, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.04.001>
- Van Landeghem, F.K.; Maier-Hauff, K.; Jordan, A.; Hoffmann, K.-T.; Gneveckow, U.; Scholz, R.; Thiesen, B.; Brück, W.; von Deimling, **2009**. A. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 30, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.044>

- Xiong, Huan-Ming, **2013**. ZnO Nanoparticles Applied to Bioimaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.* 4, 5329-35. <https://doi.org/10.1002/adma.201301732>
- Yu, K., Yoon, T., Tehrani, A., Kim, J., Park, S., Jeong, M., Ha, S., Lee, J., Kim, J., Cho, M., **2013**. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicology in Vitro.* 27, 1187-1195. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.010>
- Zhang, J., Qin, X., Wang, B., Xu, G., Qin, Z., Wang, J., Wu, L., Ju, X., Bose, D., Qiu, F., Zhou, H., Zou, Z., **2017**. Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells. *Nature: Cell Death and Disease.* 8, 2954. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.337>

5. DISCUSSÃO GERAL

A maioria dos estudos reportados na literatura utilizando ZnO-NPs avalia efeitos citotóxicos, genotóxicos e morte celular em células não tumorais e tumorais expostas a diferentes tamanhos de ZnO-NPs. Estudos utilizam ZnO-NPs de diferentes origens (comerciais ou sintetizadas) com formas e tamanhos variados. Os resultados encontrados nesta pesquisa (Capítulo I) corroboram com outras pesquisas em que as ZnO-NPs de aproximadamente 50 nm foram capazes de induzir citotoxicidade dependente da concentração em células de carcinoma colorretal. Assim, salienta-se que a caracterização adequada destes nanomateriais faz-se necessária, a fim de possibilitar o entendimento de seus diferentes efeitos em distintas linhagens celulares.

A identificação da estrutura cristalina wurtzita das nanopartículas de ZnO no presente estudo, juntamente com a análise de MET, a qual permitiu analisar o formato e as dimensões das ZnO-NPs, estão de acordo com as características das ZnO-NPs utilizadas por Guan *et al.* (2012). Em adição, o potencial zeta apresentado pelas ZnO-NP em meio de cultura apontou instabilidade das dispersões, fato que explica-se devido as forças existentes entre as partículas não serem suficientes para evitar aglomerados em meio aquoso. Além disso, verificou-se através dos resultados obtidos com DLS, os efeitos de aglomeração de ZnO-NPs, pois apresentaram um tamanho hidrodinâmico levemente maior que as ZnO-NPs analisadas por

MET. Estes resultados confirmam os achados de Ahamed *et al.* (2011), em que a análise de MET revelou um tamanho de 52 nm e, a análise de DLS, 97 nm. Já nos achados de Sharma *et al.* (2012), utilizando-se partículas com tamanho aproximado de 50 nm, revelaram que seu tamanho hidrodinâmico foi aproximadamente 4x maior na análise de DLS.

O ensaio de MTT conduzido neste estudo revelou que as ZnO-NPs reduziram a viabilidade das células de câncer colorretal proporcional ao aumento da concentração, com resultado de citotoxicidade pronunciado nas maiores concentrações de 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h, 48 e 72h. Segundo Ahamed *et al.* (2011), os efeitos de ZnO-NPs de 52nm, com tamanho hidrodinâmico de 97nm, em células de adenocarcinoma alveolar humano revelam uma redução da viabilidade celular após 24 horas de exposição, com IC50 de aproximadamente 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 24h e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h de exposição.

Meyer *et al.* (2011), também relataram uma diminuição na sobrevivência celular após a exposição de ZnO-NPs durante 24 horas de exposição em células de fibroblasto dérmico humano. Na menor concentração (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), as nanopartículas não produziram redução significativa na viabilidade celular, enquanto que a maior redução na viabilidade celular foi observada em concentrações a partir de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para Yuan *et al.* (2014), utilizando-se ZnO-NPs de 50 nm, foi possível observar concentrações ainda menores com efeitos citotóxicos em células de carcinoma de fígado humano (HepG2), com IC50 de 2,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24h e 48h, respectivamente. Somando a isso, Akhtar *et al.* (2012), também utilizando HepG2, mas com nanopartículas de 21 nm, e tamanho hidrodinâmico de 127 nm, relataram que a viabilidade celular foi significativamente afetada com 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h.

Pela interpretação visual das células de carcinoma colorretal expostas a concentrações crescentes de ZnO-NPs, evidenciou-se alterações morfológicas nas células, como retração do citoplasma, forma irregular e perda da aderência, características estas que se mostraram mais acentuadas com o aumento da concentração das ZnO-NPs. Resultados similares foram encontrados por Pandurangan *et al.* (2016), que relataram alterações morfológicas em células de carcinoma de ovário humano (HeLa) expostas por 24h às ZnO-NPs de 10nm e por Guan *et al.* (2012), que também visualizaram alterações morfológicas em células de hepatócitos humano (L02) e rim embrionário humano (HEK293) tratadas com ZnO-NPs de 50nm.

Os resultados aqui apresentados por meio de experimentos de *western blot* e imunofluorescência evidenciaram um aumento na expressão de proteínas LC3-II após exposição de ZnO-NPs, em sua maior concentração. Além disso, foi possível observar que em 6h de exposição não houve um aumento da expressão de LC3-II, mas em 12 e 18h essa

expressão se tornou visivelmente alterada. Durante o processo de autofagia, a proteína LC3 sofre clivagem, resultando na forma citosólica LC3-I e, em seguida, é conjugada a fosfatiletanolamida para formar LC3-II, e então, esta se associa à membrana do autofagossomo permanecendo até que a estrutura seja finalizada (Kabeya *et al.*, 2000). A proteína LC3-II tem sido utilizada como um dos principais marcadores para verificação da ocorrência do processo autofágico (Klionsky *et al.*, 2012).

Em continuidade aos resultados obtidos, no ensaio de distribuição topográfica por imunofluorescência indireta, no qual as células são expostas a diferentes concentrações de ZnO-NPs, observou-se aumento progressivo da expressão de LC3 A/B, sendo que, a maior concentração revelou marcação de fluorescência similar ao controle positivo para autofagia utilizando Rapamicina, possivelmente com padrão de marcação com afinidade nos autofagossomos destas estruturas celulares. Tais resultados estão em conformidade com os relatados por Yu *et al.* (2013), que descrevem um aumento relacionado ao tempo da proteína LC3 em células normais epidérmicas da pele de rato expostas à $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ZnO-NPs por 24, 48 e 72h. Já o ensaio de imunofluorescência revelou um aumento significativo com o tempo de LC3, especialmente às 48 e 72h.

Alguns estudos indicam que a indução de autofagia pode ser observada em tempos menores de exposição à ZnO-NPs. Bai *et al.* (2017), avaliando a indução de autofagia em células de câncer de ovário humano, também analisaram a expressão da proteína LC3 por *western blot* e formação de autofagossomos por imunofluorescência. Os resultados revelaram um aumento da expressão da proteína LC3-II e de LC3 nas células na concentração $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 12 h. Os autores sugerem que a ativação da autofagia pode promover ou inibir a apoptose, dependendo do nível dos danos causados por ZnO-NPs.

Além da indução de autofagia ser observada em tempos menores de exposição à ZnO-NPs, salienta-se que a geração de ERO por ZnO-NPs pode estar intimamente relacionada com a citotoxicidade. Roy *et al.* (2014) relacionam ROS com a autofagia, pois ao esgotar as enzimas antioxidantes, aumentando a peroxidação lipídica e os teores de proteína carbonila, há um aprimoramento na formação de autofagossomos através da inibição da via Akt/mTOR. ZnO-NPs causam possivelmente um acúmulo de vacúolos autofágicos e danos nas mitocôndrias através da indução de ROS, influenciando fortemente o processo de morte celular autofágica (Yu *et al.*, 2013). Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, também foi observado um acúmulo de vacúolos autofágicos com TiO₂-NPs internalizadas em hemócitos de mexilhão-dourado (Girardello *et al.*, 2016).

Alguns autores investigam os efeitos de ZnO-NPs nos lisossomos e sua relação com o fluxo autofágico frente a dissolução de íons de zinco no citoplasma. Zhang *et al.* (2017) investigaram essa relação em células epiteliais pulmonares. Os resultados mostraram que a dissolução de íons de zinco nos lisossomos pode levar a um fluxo autofágico prejudicado, causando um acúmulo de mitocôndrias danificadas, gerando ROS excessivos e causando morte celular.

Em continuidade, Loos *et al.* (2014) relatam que a disfunção lisossômica pode levar à autofagia incompleta, bem como sugere-se que ZnO-NPs podem ser dissolvidas no lisossomo causando desestabilização lisossomal em células THP-1 e posterior morte celular (Cho *et al.*, 2014). A literatura também aponta que os íons de zinco podem se acumular especificamente nos endossomas e lisossomas de células epiteliais alveolares tratadas com ZnO-NPs (Mihai *et al.*, 2015). Estes resultados mostram que as ZnO-NPs podem ser dissolvidos em lisossomos causando disfunção lisossômica, porém o mecanismo regulatório e efeito biológico da disfunção lisossômica permanece pouco esclarecido até o momento (Zhang *et al.*, 2017). É possível que a morte celular possa ocorrer quando as células tentam se recuperar do estresse, por remoção de biomoléculas celulares danificadas utilizando autofagossomos. Porém, muitas vezes, tal processo não se completa, levando células com danos irrecuperáveis à morte apoptótica (Arakha *et al.*, 2017).

Frente ao exposto, pode-se observar que a literatura aborda diferentes estudos e apresenta efeitos citotóxicos das nanopartículas de óxido de zinco em distintos modelos celulares. Assim, os efeitos são dependentes da concentração e do tempo de exposição dos ZnO-NPs conforme demonstrou-se no Capítulo I. Em geral, a literatura evidencia que concentrações abaixo de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ZnO-NP apresentam baixa toxicidade *in vitro*. Outro ponto que parece consensual trata-se do momento de exposição do material ao meio biológico. Os tratamentos agudos têm taxas mais baixas de citotoxicidade e de alterações celulares em comparação com exposições crônicas.

No entanto, parece existir um limiar de concentração que induz a morte celular, como, por exemplo, apoptose ou autofagia. Sugere-se que a internalização de ZnO-NP (Figura 8) pode ocorrer através de endocitose mediada por receptores, seguida de hidrólise das nanopartículas dentro dos lisossomas e liberação de íons de zinco no citosol (Taccola *et al.*, 2011, Sabella *et al.*, 2014) e também pode ser degradada em compartimentos celulares conhecidos como autofagolisossomos em um processo conhecido como autofagia. Conforme embasamento científico e a pesquisa que aqui apresentada, pode-se observar que a autofagia

parece estar intimamente relacionada aos processos oxidativos intracelulares, e alguns autores ainda apontam para processos inflamatórios, como a participação na indução de autofagia.

Frente aos efeitos da exposição de ZnO-NPs sobre o metabolismo celular tumoral apresentados neste estudo, os quais corroboram com os dados na literatura para outras linhagens tumorais, pode-se considerar que as ZnO-NPs são possíveis fontes alternativas para estratégias de terapia na área da oncologia, dada a necessidade de se desenvolver novas classes de agentes anticancerígenos.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a caracterização das ZnO-NPs mostrou composição instáveis com tendência a aglomeração quando inseridas em meio de cultura;
- o ensaio MTT revelou que as ZnO-NPs reduzem a viabilidade celular da linhagem de carcinoma colorretal HCT-116;
- o ensaio clonogênico mostrou que as ZnO-NPs causaram uma diminuição do número de colônias formadas por células de carcinoma colorretal;
- a exposição das células de carcinoma colorretal às ZnO-NPs causou uma retração do citoplasma e diminuição da confluência e aderência das células, monitoradas por microscópio de contraste de fase;
- a análise de *western blot* revelou indução de autofagia com aumento de expressão de LC3 A/B após diferentes tempos de incubação das células de carcinoma colorretal expostas a doses correspondentes ao IC50 de ZnO-NPs;
- o ensaio de imunofluorescência indireta confirmou os resultados de *western blot*, indicando regiões topográficas de expressão de LC3 A/B em células de câncer colorretal tratadas com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ZnO-NPs.

7. PERSPECTIVAS

- realizar a técnica de Brunauer-Emmett-Teller (BET) para verificar a área superficial das ZnO-NPs;
- verificar a expressão de outras proteínas relacionadas a autofagia por *western blot* e Imunofluorescência Indireta;
- verificar a geração de espécies reativas de oxigênio;
- verificar danos genotóxicos ao DNA através da técnica de Cometa;
- avaliar efeitos mutagênicos no DNA através da técnica de Micronúcleos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, **2013**. Relatório de Acompanhamento Setorial: Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/relatorio-nanotecnologia.pdf>> Acesso em 30 de setembro de 2017.
- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Raja, M., Ahmad, I., Siddiqui, M.K.J., AlSalhi, M.S., Alrokayan, S.A., **2011**. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: role of oxidative stress. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 7, 904–913.
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.M., Ahmad, J., Alrokayan, S.A., **2012**. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int. J. Nanomedicine*. 7,845-857.
- Aksoy, B., Atakan, N, Aksoy, H.M., Tezel, G.G., Renda, N., Ozkara, H.A., Onder, E., **2010**. Effectiveness of topical zinc oxide application on hypertrophic scar development in rabbits. *Burn*. 36, 1027-1035.
- Alers, S., Loffler, A.S., Wesselborg, S., Stork B., **2012**. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell Biol*. 32, 2-11.
- Ali, D.; Alarifi, S.; Alkahtani, S.; AlKahtane, A.A.; Almalik, A, **2014**. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human skin melanoma cells. *Cell Biochem. Biophys*. 71, 1643–1651.
- Alili, L.; Sack, M.; Karakoti, A.S.; Teuber, S.; Puschmann, K.; Hirst, S.M.; Reilly, C.M.; Zanger, K.; Stahl, W.; Das, S., **2011**. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials*. 32, 2918–2929.
- Amaravadi, R., Kimmelman, A. C. & White, E., **2016**. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 30, 1913-1930.

- Arakha, M., Roy, J., Nayak, P., Mallick, B., Jha, S., **2017**. Zinc oxide nanoparticle energy band gap reduction triggers the oxidative stress resulting into autophagy-mediated apoptotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 110, 42-53.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manfava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T., **2008**. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685-701.
- Bai, D., Zhang, X., Zhang, G., Huang, Y., Gurunathan, S., **2017**. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*. 12, 6521–6535.
- Bastiani, M., Parton, R. G., **2010**. Caveolae at a glance. *J. Cell Sci.* 123(22): 3831-3836.
- Becheri, A., Durr, M., Nostro, P., Baglioni, P., **2008**. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers, *J. Nanopart. Res.* 10, 679-689.
- Berardi, M. J., Fantin, V.R., **2011**. Survival of the fittest: metabolic adaptations in cancer. *Curr. Opin Genet. Dev.* 21, 59-66.
- Bisht, G. & Rayamajhi, S., **2016**. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine*. 3, 9.
- Blanca Laffon, João Paulo Teixeira., **2013**. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment International*. 55, 92–100.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A., **2013**. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol.* 87, 1181-1200.

- Brech, A.; Ahlquist, T.; Lothe, R.A. E Stenmark, H., **2009**. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Molecular Oncology*. 3, 366-375.
- Cash, K.J., Clark, H.A., **2010**. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends Mol. Med.* 16, 584-593.
- Chakraborti, S., Chakraborty, S., Saha, S., Manna, A., Banerjee, S., Adhikary, A., Sarwar, S., Hazra, K.T., Das, T., Chakraborti, P., **2017**. PEG-functionalized zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent impairment of DNA damage repair enzyme NEIL2. *Free Radical Biology and Medicine*. 103, 35-47.
- Cho, W.S., Duffin, R., Howie, S.E., Scotton, C.J., Wallace, W.A., Macnee, W., **2011**. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Part. Fibre. Toxicol.* 6, 8-27.
- Cisterna, B.A., Kamaly, N., Choi, W., Tavakkoli, A., Farokhzad, O.C., Vilos, C., **2016**. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine (Lond.)*. 11, 2443–2456.
- Clausen, C. A., Green III, F., Kartal, S. N., **2010**. Weatherability and leach resistance of wood impregnated with nano-zinc oxide. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 1464-1467.
- Clemente, Z., Castro, V. L., Jonsson, C. M., Fraceto, L. F., **2012**. Ecotoxicology of Nano-TiO₂ – An Evaluation of its Toxicity to Organisms of Aquatic Ecosystems. *Int. J. Environ. Res.* 6, 33-50.
- Cohignac, V., Landry, M.J., Boczkowski, J., Lanone, S., **2014**. Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials*. 4, 548-582.
- De Rosa, M.D.; Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., Delrio, P., **2015**. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol. Rep.* 34, 1087-1096.

- Deter, R.L., De Duve, C., **1967**. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33, 437-449.
- Doherty & McMahon, **2009**. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78, 857-902.
- Duncan, R., **2003**. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Rev. Drug Discov.* 2, 347-360.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., Meldolesi, J., **2006**. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* 119(22): 4758-4769.
- Ferreira, L. A. B., Radaic, A., Pugliese, G. O., Valentini, M. B., Oliveira, M. R., de Jesus M. B., **2014**. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. *Acta Farmacêutica Portuguesa.* 3(2), 143-154.
- Ghodake, G., Seo, Y. D., Lee, D. S., **2011**. Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater.* 186, 952–955.
- Girardello, F., Leite, C., Branco, C., Roesch-Ely, M., Fernandes, A., Salvador, M., Henriques, J. A. P., **2016**. Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Aquatic Toxicology.* 176, 190-196.
- Giuliani, C. M., Dass, C. R., **2013**. Autophagy and cancer: taking the toxic out of cytotoxics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 65, 777- 789.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K., **2010**. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
- GLOBOCAN, 2012. Disponível em < <http://globocan.iarc.f>> Acesso em 10 ago 2017.

- Gottlieb, E., Armour, S.M., Harris, M.H., Thompson, C.B., **2003**. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10, 709-717.
- Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., Liu, M., **2012**. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters.*7, 602.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., **2011**. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646-74.
- Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K.M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., Wingett, D., **2008**. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology.* 19, 295103 5.
- He, C. & Klionsky, D.J., **2009**. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev. Genet.* 43, 67-93.
- Hernandez, A. B., Gonzalez, R., Viesca, J.L., Fernandez, J.E., Díaz Fernández, J.M., Machado, A., Chou, R., Riba, J., **2008**. CuO, ZrO₂ and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants. *Wear.* 265, 422-428.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M., Ploegh, H. L., **2003**. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J. Biol. Chem.* 19; 278 (51), 51841-50.
- Hillaireau & Couvreur, **2009**. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2873–2896.
- INCA, 2017a. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>; Acesso em: 10 ago 2017.

INCA, 2017b. Disponível em: <
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>>; Acesso: 10 ago 2017.

Jiang, X., Röcker, C., Hafner, M., Brandholt, S., Dörlich, R. M., Nienhaus, G. U., **2010**. Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells. *ACS Nano*. 4: 6787–6797.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., **2000**. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 19:5720–5728.

Klein, S.; Sommer, A.; Distel, L.V.; Hazemann, J.L.; Kröner, W.; Neuhuber, W.; Müller, P.; Proux, O.; Krysch, C., **2014**. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as novel X-ray enhancer for low-dose radiation therapy. *J. Phys. Chem. B*. 118, 6159–6166.

Lajoie, P., Nabi, I, **2007**. Regulation of raftdependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med*. 11(4): 644–653.

Langer, R., **1998**. Drug delivery and targeting. *Nature*. 392, 5–10.

Leinonen, A., Kivisaari, S., **2010**. Nanotechnology perceptions: Literature review on media coverage, public opinion and NGO perspectives. *Vtt Research Notes*. Espoo, 1-55.

Levy, J. M. & Thorburn, A., **2011**. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol. Ther*. 131, 130-141.

Levy, J. M. M., Towers, C. G., Thorburn, A., **2017**. Targeting autophagy in câncer. *Nature Reviews*. 17, 528-542.

Li, W., Chen, C. Y., Ye, C., Wei, T. T., Zhao, Y. L., Lao, F., Chen, Z., Meng, H., Gao, Y. X., Yuan, H., Xing, G. M., Zhao, F., Chai, Z. F., Zhang, X. J., Yang, F. Y., Han, D., Tang, X. H., Zhang, Y. G., **2008**. *Nanotechnology*. 19, 145102.

- Li, Y., J. Zhang, J., Liu, T., Chen, Y., Zeng, X., **2012**. Molecular Machinery of Autophagy and Its Implication in Cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*.343 (2), 155-161.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B., **1999**. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 402, 672-6.
- Loos, B., du Toit, A., Hofmeyr, J.H., **2014**. Defining and measuring autophagosome flux- concept and reality. *Autophagy*. 10, 2087-2096.
- Mathew, R. & White, E., **2011**. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr. Opin Genet Dev*. 21, 113-119.
- Mc Mahon, H. T., Boucrot, E., **2011**. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 12(8): 517-533.
- Meyer, K., Rajanahalli, P., Ahamed, M., Rowe, J., Hong, Y., **2011**. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in Vitro*. 25, 1721-1726.
- Mihai, C., Chrisler, W.B., Xie, Y., Hu, D., Szymanski, C.J, Tolic, A., **2015**. Intracellular accumulation dynamics and fate of zinc ions in alveolar epithelial cells exposed to airborne ZnO nanoparticles at the air-liquid interface. *Nanotoxicology*. 9, 9-22.
- Mizushima, N., **2007**. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 15, 21(22): 2861-73.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., **2008**. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451, 1069-1075.
- Muller, K. H., Kulkarni, J., Motoskin M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J.N., Ryan M.P., Porter, A.E., **2010**. pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution. *ACS Nano*. 4, 6767-79.

- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., **2009**. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458-467.
- Pandurangan, M., Enkhtaivan, G., Kim, D.H., **2016**. Anticancer studies of synthesized ZnO nanoparticles against human cervical carcinoma cells. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* 158, 206-211.
- Pati, R., Das I., Mehta, R.K., Sahu, R., Sonawane, A., **2016**. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicol. Sci.* 150, 454-472.
- Oh, N. & Park, J., **2014**. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine.* 9, 51-63.
- Rasmussen, J., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D., **2010**. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 7, 1063-107.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., Rubinsztein, D. C., **2010**. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 90(4):1383-435.
- Roy, R., Singh, S.K., Chauhand, L.K., Das, M., Tripathia, A., Dwivedia P.P., **2014**. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicology Letters.* 227, 29-40.
- Sabella, S., Carney, R. P., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Al-Juffali, N., Vecchio, G., Janes, S. M., Bakr, O. M., Cingolani, R., Stellacci, F., Pompa, P. P., **2014**. *Nanoscale.* 6, 7052–7061.

- Sahay, G., Alakhova, D. Y., Kabanov, A. V., **2010**. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control Release*. 145:182–195.
- Sahdev, P., Podaralla, S., Kaushik, R.S., Perumal, O., **2013**. Calcium phosphate nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 132-141.
- Sahoo, S. K.; Parveen, S.; Panda, J. J., **2007**. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 3, 20-31.
- Sankar, R.; Maheswari, R.; Karthik, S.; Shivashangari, K.S.; Ravikumar, V., **2014**. Anticancer activity of *Ficus religiosa* engineered copper oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*, 44, 234–239.
- Schulz, P.A., **2013**. Nanomateriais e a interface entre nanotecnologia e ambiente. *Vigilância Sanitária em Debate*; 1, 53-58.
- Senapati, V.A., Kumar, A., Gupta, G. S., Pandey, A. K., Dhawan, A., 2015. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. *Food and Chemical Toxicology* 85, 61-70.
- Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D. Das M., Dhawan, A., **2009**. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*. 185, 211-218.
- Sharma, Y., Anderson, D., Dhawan, A., 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*. 17, 852-870.
- Siddiqui, M.A.; Alhadlaq, H.A.; Ahmad, J.; Al-Khedhairi, A.A.; Musarrat, J.; Ahamed, M., **2013**. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *PLoS ONE*, 8.

- Simonsen, A., Tooze, S.A., **2009**. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773-782.
- Sruthi, S., Mohanan, P.V., **2015**. Investigation on cellular interactions of astrocytes with zinc oxidenanoparticles using rat C6 cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 133, 1-11.
- Stern, S.T, Adiseshaiah, P.P, Crist, R.M, **2012**. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part . *Fibre Toxicol.* 14, 9-20.
- Strunk, J., Kahler, K., Xia, X., Muhler, M., **2009**. The surface chemistry of ZnO nanoparticles applied as heterogeneous catalysts in methanol synthesis. *Surf. Sci.* 603, 1776-1783.
- Swartz, M.A, lida N., Roberts, E.W, Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., Coussens, L.M., DeClerck, Y.A., **2012**. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 15, 2473-2480.
- Taccola, L., Raffa, V., Riggio, C., Vittorio, O., Iorio, M. C., Vanacore, R., Pietrabissa, A., Cuschieri, A., **2011**. *International Journal of Nanomedicine.* 6, 1129-1140.
- Thevenot, P.; Cho, J.; Wavhal, D.; Timmons, R.B.; Tang, L., **2008**. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine.* 4, 226-236.
- Thurn, K. T., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E. M., Doty, C., Kremer, J., Woloschak, G., 2011. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine.* 7(2):123-3.
- Toumey, C., **2008**. Reading Feynman into nanotechnology: a text for a new science. *Techné,* 13, 133-168.
- Towers, C. G. & Thorburn, A., **2013**. Therapeutic targeting of autophagy. *E Bio Medicine.* 14, 15-23.

- Tran, D. T., Salmon, R., **2011**. Potential photocarcinogenic effects of nanoparticle sunscreens, *Australas. J. Dermatol.* 52, 1-6.
- Turcotte, S, Chan, D.A., Sutphin, P.D., Hay, M.P., Denny, W.A., Giaccia, A. J., **2008**. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell.* 14, 90-102.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., von Mikecz, A., Grether-Beck, S., Schins, R.P.F., **2007**. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology.* 1, 52-71.
- Valdiglesias, V., Costa, C., Kiliç, G., Costa, S., Pásaro, E., Senapati, V.A., Kumar, A., Gupta, G.S., Pandey, A.K., Dhawan, A., **2015**. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. *Food and Chemical Toxicology.* 85, 61-70.
- Vinardell, M. P. & Mitjans, M., **2015**. Antitumor Activities of Metal Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials.*, 5, 1004-1021.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K., Zweck, A., **2006**. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol.* 24,1211-1217.
- Wahab, R.; Siddiqui, M.A.; Saquib, Q.; Dwivedi, S.; Ahmad, J.; Musarrat, J.; Al-Khedhairy, A.A.; Shin, H.S. **2014**. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf. B*, 117, 267–276.
- Wang, Y.; Yang, F.; Zhang, H.-X.; Zi, X.Y.; Pan, X.H.; Chem, F.; Luo, W.D.; Li, J.X.; Zhu, H.Y.; Hu, Y.P., **2013**. Cuprous oxide nanoparticles inhibit the growth and metastasis of melanoma by targeting mitochondria. *Cell Death Dis.*, 4.

- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H.G., Zhu, X., **2014**. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842, 1240–1247.
- Wang, J., Yu, Y., Lu, K., Yang, M., Li, Y., Zhou, X., Sun, Z., **2017**. Silica nanoparticles induce autophagy dysfunction via lysosomal impairment and inhibition of autophagosome degradation in hepatocytes. *International Journal of Nanomedicine.* 12, 809-825.
- Wason, M.S.; Colon, J.; Das, S.; Seal, S.; Turkson, J.; Zhao, J.; Baker, C.H., **2013**. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. *Nanomedicine.* 9, 558–569.
- WHO (**2013**) WHO - World Health Organization. Disponível (online): <http://www.who.int/cancer/en/>. (Agosto de 2017).
- Wood, A., Schneider, J., Shilatifard, A., **2005**. Cross-talking histones: implications for the regulation of gene expression and DNA repair. *Biochem. Cell Biol.* 83, 460-467.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., Nel, A. E., **2008**. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano.* 2(10): 2121-34.
- Xiong, H.M., **2013**. ZnO Nanoparticles Applied to Bioimaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.* 4, 5329-35.
- Xu, F., Zhang, P., Navrotsky, A., Yuan, Z.Y., Ren, T.Z., Halasa, M., Su, B.L., **2007**. Hierarchically assembled sporous ZnO nanoparticles: synthesis, surface energy, and photocatalytic activity. *Chem. Mater.* 19, 2580–2686.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., **2010**. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin Cell Biol.* 22, 124-131.

- Yu, K., Yoon, T., Tehrani, A., Kim, J., Park, S., Jeong, M., Ha, S., Lee, J., Kim, J., Cho, M., **2013**. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicology in Vitro*. 27, 1187-1195.
- Yuan, L., Wang, Y., Wang, J., Xiao, H., Liu, X., **2014**. Additive effect of zinc oxide nanoparticles and isoorientin on apoptosis in human hepatoma cell line. *Toxicology Letters*. 225, 294-304.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., Heintz, N., **2003**. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1077-82.
- Zhang, J., Qin, X., Wang, B., Xu, G., Qin, Z., Wang, J., Wu, L., Ju, X., Bose, D., Qiu, F., Zhou, H., Zou, Z., **2017**. Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells. *Nature: Cell Death and Disease*. 8, 2954.
- Zhang, S., Saebfar, H., **2010**. Chemical information call-in candidate: nano zinc oxide, California Dept. of Toxic Substances Control. 1–11.