

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ANA CAROLINE SILVA

**EFEITOS CITOTÓXICOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (Sb_2O_3) EM
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

**PONTA GROSSA
2020**

ANA CAROLINE SILVA

**EFEITOS CITOTÓXICOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (Sb_2O_3) EM
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
graduação em Ciências Biomédicas da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Dietrich Moura Costa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Katia Sabrina Paludo

**PONTA GROSSA
2020**

S586 Silva, Ana Caroline
Efeitos citotóxicos do trióxido de antimônio (Sb_2O_3) em diferentes linhagens celulares / Ana Caroline Silva. Ponta Grossa, 2020.
65 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa.

Coorientadora: Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo.

1. Viabilidade celular. 2. Trióxido de antimônio. 3. Estresse oxidativo. 4. Apoptose. I. Costa, Michele Dietrich Moura. II. Paludo, Katia Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV.T.

CDD: 575



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, ATA N. 07/2020, DA MESTRANDA ANA CAROLINE SILVA REALIZADA NO DIA 21 DE AGOSTO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

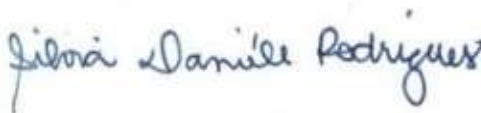
Aos 21 dias de agosto de dois mil e vinte, às 09 h, em conformidade com o Art.2º da Portaria Capes n.36 de 19 de março de 2020, em seção pública por vídeo conferência na plataforma Google Meet, sob a presidência da **Professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Ana Caroline Silva** na linha de pesquisa Biologia Celular e Molecular do Desenvolvimento e de Processos Patológicos, constituída pelos demais membros titulares: **Professora Dra. Carla Cristine Kanunfre (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Sílvia Danièle Rodrigues (UFPR/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“EFEITOS CITOTÓXICOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (Sb₂O₃) EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES”**. Encerrada a defesa e, após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADA considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A acadêmica deverá entregar ao Programa a versão final da dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015. Para a obtenção do título de Mestre, a acadêmica terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.



Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa 1- (DEBIOGEM - UEPG) - Presidente



Prof. Dra. Carla Cristine Kanunfre 2- (DEBIO - UEPG) - Titular



Prof. Dra. Sílvia Danièle Rodrigues - (UFPR - PR) - Titular

Ponta Grossa, 21 de agosto de 2020.

***A todos que chegaram até aqui:
Quando você pensar em desistir,
lembre-se dos motivos que te fizeram
aguentar até agora. É a persistência
que realiza sonhos.***

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, professora Michele, pela confiança que depositou em mim ao me aceitar como orientanda e por ter agregado tanto a minha vida acadêmica. Agradeço por ser uma excelente profissional, mas, sobretudo, por ser um ser humano tão incrível!!!

A todos os profissionais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, principalmente as professoras Iriane e Kátia e aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia por me proporcionarem experiências tão maravilhosas que colaboraram para que eu me tornasse uma profissional melhor.

Aos alunos do grupo Dietrich: Gabriel, Viviane e Mônica, pelas conversas, pela cumplicidade e pelas playlists utilizadas no laboratório. Vocês são incríveis.

À Maria, técnica no laboratório, que me ajudou muito com as tarefas diárias. Obrigada também por dividir suas experiências e por me tratar com tanto carinho.

Ao Cleyson, por ter me ajudado muito durante o mestrado, pelas cervejas consoladoras e por ser tudo que um amigo deve ser.

Aos meus amigos e minhas primas por serem tão presentes em minha vida, por ouvirem meus desabafos, por me acolherem quando eu preciso e por deixarem minha vida mais divertida.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio incondicional, por todo cuidado e amor dedicados a mim. Obrigada pelo incentivo e pelo amparo. Vocês são tudo pra mim.

À minha filha Lívia. Você é a melhor parte de mim filha. Eu te amo mais que tudo no mundo.

A todas as pessoas, que assim como eu, acreditam que a ciência salva vidas, principalmente neste momento difícil de pandemia. Não podemos desistir!

RESUMO

O antimônio (Sb) é um metaloide que pode apresentar-se na forma de sulfetos ou óxidos. A disponibilidade no ambiente da sua forma trivalente (Sb_2O_3) teve um aumento em decorrência das atividades antrópicas e de sua utilização como sinergista principalmente na fabricação de materiais retardantes de chama, resinas plásticas tal como o PVC e como catalisadores para produção de PET. Entretanto, o conhecimento sobre seus efeitos tóxicos para as células é limitado. Diante do exposto, torna-se essencial ampliar o conhecimento sobre seu potencial citotóxico. Nesse contexto, o presente trabalho visou testar a capacidade citotóxica do Sb_2O_3 sobre diferentes linhagens celulares para descrever as possíveis alterações celulares decorrentes da exposição a esse composto. Para tanto, foram utilizadas linhagens celulares com diferentes origens: 3T3, HeLa, PC12, Neuro-2a e SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição com Sb_2O_3 e a viabilidade celular analisada pelo método de redução de MTT. O Sb_2O_3 apresentou citotoxicidade em todas as células testadas. As células de origem nervosa foram menos suscetíveis ao tratamento quando comparadas as células 3T3 e HeLa. A concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (CI_{50}), no tempo de 24 horas, foi de 6,87 μM para a linhagem 3T3 e 26,06 μM para HeLa e, em 48 horas, foi 7,09 μM e 12,94 μM para 3T3 e HeLa, respectivamente. Células PC12 apresentaram redução na viabilidade celular apenas na maior concentração testada de 128 μM e o CI_{50} foi de 94,22 μM em 24 horas e 84,91 μM em 48 horas. O CI_{50} obtido para Neuro-2a em 24 e 48 horas foi de 30,61 μM e 25,46 μM , respectivamente. Para SH-SY5Y o CI_{50} estimado foi de 127,35 μM e 80,35 μM em 24 e 48 horas. Células SH-SY5Y não apresentaram redução de viabilidade por tempo de exposição prolongado (120 horas) em concentrações de até 32 μM . O ensaio de coloração May Grunwald-Giemsa mostrou indícios de morte por apoptose em células HeLa e SH-SY5Y. Esses dados demonstram que o Sb_2O_3 possui atividade citotóxica em linhagens de células tumorais e não-tumorais. Os mecanismos envolvidos nessa citototoxicidade ainda precisam ser esclarecidos, mas podem estar envolvidos com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Palavras-chave: Viabilidade celular, Sb_2O_3 , Estresse oxidativo, Apoptose.

ABSTRACT

Antimony (Sb) is a metalloid that can be in the form of sulfides or oxides. Its trivalent form (antimony trioxide - Sb_2O_3) had an increase in availability in the environment, a consequence of anthropogenic activities and its use as a synergist mainly in the manufacture of flame retardant materials, plastic resins such as PVC and catalysts for PET production. However, knowledge about the toxic effects cells is limited. Given that, it is essential to expand knowledge about its cytotoxic potential. In this context, the present study aimed to test the cytotoxic capacity of Sb_2O_3 on different cell lines to describe the possible cell changes resulting from exposure to this compound. For that, cell lines with different origins were used: 3T3, HeLa, PC12, Neuro-2a and SH-SY5Y. The cells were exposed to different concentrations and exposure times with Sb_2O_3 and the cell viability analyzed by the MTT reduction method. Sb_2O_3 showed cytotoxicity in all cells tested. Nerve cells were less susceptible to treatment when 3T3 and HeLa cells were compared. The 50% inhibitory concentration of cell viability (IC_{50}) in 24 hours was $6.87\mu\text{M}$ for the 3T3 line and $26.06\mu\text{M}$ for HeLa and in 48 hours it was $7.09\mu\text{M}$ and $12.94\mu\text{M}$ for 3T3 and HeLa, respectively. PC12 cells showed a reduction in cell viability only at the highest tested concentration of $128\mu\text{M}$ and the IC_{50} was $94.22\mu\text{M}$ and $84.91\mu\text{M}$ in 24 and 48 hours, respectively. The IC_{50} obtained for Neuro-2a in 24 and 48 hours was $30.61\mu\text{M}$ and $25.46\mu\text{M}$, respectively. For SH-SY5Y the estimated IC_{50} was $127.35\mu\text{M}$ and $80.35\mu\text{M}$ in 24 and 48 hours. SH-SY5Y cells did not show viability reduction due to prolonged exposure time (120 hours) in concentrations up to $32\mu\text{M}$. The May Grunwald-Giemsa staining assay showed evidence of death from apoptosis in HeLa and SH-SY5Y cells. These data demonstrate that Sb_2O_3 has cytotoxic activity in tumors and non-tumor cell lines. The mechanisms involved in this cytotoxicity have yet to be clarified, but they may be involved in the production of reactive oxygen species (ROS).

Keywords: Cell viability, Sb_2O_3 , Oxidative stress, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição do consumo global de antimônio.....	15
Figura 2	– Representação esquemática do mecanismo subjacente ao eixo de sinalização Nrf2-Gadd45b como papel protetor na apoptose celular induzida por Sb ₂ O ₃	25
Figura 3	– Redução dos níveis dos metabólitos TCA por antimônio.....	26
Figura 4	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células 3T3 em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de tratamento.....	33
Figura 5	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células HeLa em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de tratamento.....	34
Figura 6	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células PC12 em diferentes concentrações por 24 e 48 horas..	35
Figura 7	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade células Neuro-2a em diferentes concentrações e tempos de tratamento.....	36
Figura 8	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células SH-SY5Y com diferentes concentrações em 24 e 48 horas de tratamento.....	37
Figura 9	– Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade células HeLa em diferentes concentrações e tempos de tratamento.....	39
Figura 10	– Efeito do trióxido de antimônio sobre células SH-SY5Y em diferentes concentrações e tempos de tratamento	41
Figura 11	– Alterações morfológicas encontradas nas células HeLa tratadas com diferentes concentrações de trióxido de antimônio por 24 horas.....	43
Figura 12	– Alterações morfológicas encontradas nas células HeLa tratadas com 32 µM de trióxido de antimônio por 24 horas..	44
Figura 13	– Alterações morfológicas encontradas nas células SH-SY5Y com diferentes concentrações de trióxido de antimônio por 24 horas.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de citotoxicidade utilizando Sb.....	23
Tabela 2 – Valores da concentração inibitória mínima (CI ₅₀) de Sb ₂ O ₃ , nas concentrações de 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM e 128 µM sobre diferentes linhagens celulares.....	37
Tabela 3 – Valores da concentração inibitória mínima (CI ₅₀) de Sb ₂ O ₃ , nas concentrações de 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM, 25 µM e 32 µM em células HeLa, de um a cinco dias de tratamento.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3	Fibroblasto de Camundongo
As	Arsênio
BSO	Butionina Sulfoximina
Chk1	Ponto de verificação quinase 1
Cl ₅₀	Concentração inibitória 50% da viabilidade celular
CMP	Concentração Máxima Permitida
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA DSB	DNA dupla fita
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês – <i>Environmental Protection Agency</i> .
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HeLa	Adenocarcinoma humano
HEPES	ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanossulfônico)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do câncer, do inglês – <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDC	Ingestão Crônica Diária
JNK	c-Jun cinases N-terminais
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio
NCBI	Centro Nacional de Informações de Biotecnologia, do inglês – <i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neuro-2a	Neuroblastoma murino
Nrf2	Fator de transcrição 2
OMS	Organização Mundial da Saúde, do inglês – <i>World Health Organization</i>
Pb	Chumbo
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês – <i>Phosphate Buffered Saline</i>

PC12	Feocromocitoma de rato
PET	Tereftalato de polietileno
pH	Potencial de hidrogênio
PVC	Cloreto polivinílico
RNA	Ácido ribonucleico
Sb	Antimônio
SFB	Soro Fetal Bovino
SH-SY5Y	Neuroblastoma Humano
TCA	Ácido Tricarboxílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	ANTIMÔNIO	14
3.2	TOXICIDADE DO ANTIMÔNIO	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	LINHAGENS CELULARES.....	27
4.2	DILUIÇÃO DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (SB_2O_3)	27
4.3	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO SB_2O_3	28
4.3.1	Ensaio de redução com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)	28
4.3.2	Determinação do Cl_{50}	29
4.4	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS TRATADAS COM SB_2O_3 POR MAY GRUNWALD-GIEMSA.....	30
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
5	RESULTADOS	32
5.1	CITOTOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO EM 24 E 48 HORAS.	32
5.2	CITOTOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR SB_2O_3 EM CÉLULAS HELA E SH-SY5Y POR 24, 48, 72, 96 E 120 HORAS.	38
5.3	ENSAIO DE ANÁLISE MORFOLÓGICA COM MAY GRUNWALD- GIEMSA NAS LINHAGENS CELULARES DE ADENOCARCINOMA HUMANO (HELA) E NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y).....	42
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O antimônio (Sb) é um metaloide, cuja forma elementar é caracterizada por ser um sólido frágil com uma coloração que vai do branco ao prateado. Possui alta mobilidade química e normalmente coexiste com outros metais como o arsênio (As). Possui diversos estados de oxidação, permitindo frequentemente apresentar-se como sulfetos ou óxidos, como é o caso do trióxido de antimônio (Sb_2O_3) (Belzile; Chen; Filella, 2002; Anderson, 2012; Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017). Esses processos de oxi-redução ocorrem de forma natural e permitem que esse composto esteja presente em níveis traços em todo meio ambiente (Arai, 2010).

Entretanto, atividades antrópicas têm elevado sua disponibilidade na natureza tornando-se um viés importante na contaminação por Sb_2O_3 (He *et al.*, 2019). A emissão de Sb_2O_3 pelo ar, pode resultar em efeitos na pele e olhos. Os efeitos respiratórios incluem inflamação nos pulmões, bronquite e enfisema crônico na exposição a longo prazo. A exposição oral exerce forte efeito irritante na mucosa gástrica e provoca vômito, além de cólica abdominal, diarreia e toxicidade cardíaca. Porém, há várias formas de exposição e a informação sobre seu potencial tóxico ao organismo, tecidos, ou às células são insuficientemente conhecidos (Belzile; Chen; Filella, 2002; Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017).

Apesar de se conhecer as formas de exposição, existe uma fonte limitada de informações atualizadas sobre a citotoxicidade induzida por Sb_2O_3 . Considerando escassos os dados científicos sobre sua citotoxicidade e o aumento de antimônio disponível, o presente trabalho visa avaliar o efeito citotóxico do Sb_2O_3 em linhagens celulares considerando a especificidade de cada tipo celular. Foram utilizadas células de fibroblasto de camundongo (3T3), como parâmetro de célula não tumoral e células tumorais de adenocarcinoma humano (HeLa) para uma análise comparativa. Um metalóide análogo químico ao Sb (Arsênio – As) possui a capacidade de provocar disfunção cognitiva e neurológica, portanto selecionamos células de origem nervosa para os ensaios com Sb_2O_3 : células de feocromocitoma de rato (PC12), neuroblastoma murino (Neuro-2a) e células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos do Sb_2O_3 em diferentes linhagens celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar a viabilidade celular entre diferentes linhagens celulares tratadas com diferentes concentrações de Sb_2O_3 e períodos de tempo variados.
- Determinar o CI_{50} do Sb_2O_3 para as diferentes linhagens;
- Investigar as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento das linhagens celulares com o Sb_2O_3 .

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIMÔNIO

O antimônio é um metaloide pertencente à família 15 (5A) da tabela periódica, apresenta 5 elétrons na camada de valência. Sua configuração eletrônica - 4d¹⁰ 5s² 5p³ - disponibiliza a utilização dos orbitais 5s² 5p³ possibilitando que o antimônio apresente vários estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5 (Tylanda; Sullivan; Fowler, 2015). O Sb possui massa molecular de 121,76 g/mol, número atômico 51, densidade de 6,697 kg/m³ a 26°C e elevados pontos de fusão e ebulição (Labsynth, 2017).

O antimônio pode apresentar compostos inorgânicos nas formas trivalentes (Sb³⁺), caracterizadas por serem dez vezes mais tóxicas do que formas pentavalentes (Sb⁵⁺), mas também podem apresentar compostos orgânicos considerados menos tóxicos (Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017).

O antimônio é primariamente caracterizado em temperatura ambiente como um sólido branco-prateado e quebradiço, porém, raramente é encontrado nessas condições, devido a sua mobilização a partir de minerais e rochas relacionadas. Dessa forma, apresenta-se principalmente na forma de sulfetos ou óxidos. O óxido sob a forma de Sb₂O₃ é uma das maiores fontes deste elemento, encontrado principalmente em minérios de cobre, prata e chumbo. No ambiente natural o antimônio também pode, frequentemente, coexistir com outros metaloides, como o arsênio, devido ao seu comportamento geoquímico semelhante (Belzile; Chen; Filella, 2002).

De forma geral, a presença do antimônio a níveis traços no meio ambiente deve-se a processos naturais, tais como: intemperismo das rochas causando mobilização a partir de minerais e rochas relacionadas, intemperismo de solos pela ação de agentes atmosféricos (erosão), erupções vulcânicas e incêndios florestais naturais (Arai, 2010; Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017).

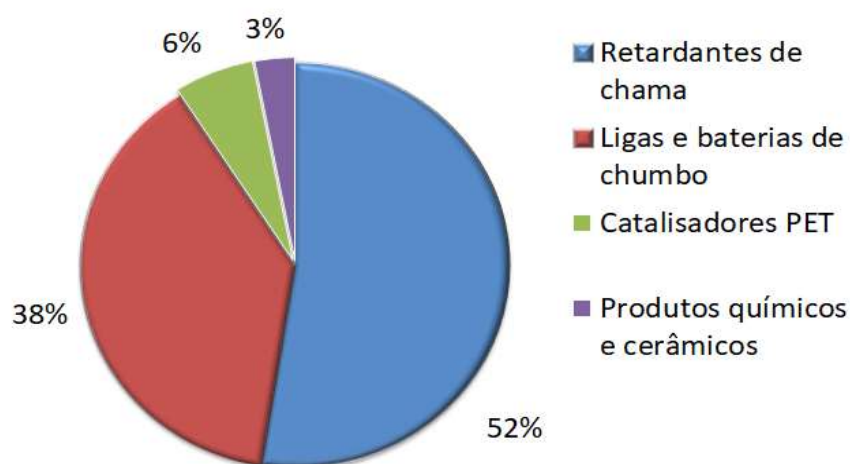
A maioria do antimônio é emitida como Sb₂O₃ no ar, na água e no solo a partir de fontes de poluição (He; Wang; Wu; Fu, 2012; Tian *et al.*, 2012). Em seguida ele se dissolve e é liberado no meio ambiente, e sua transformação afeta sua mobilidade e biodisponibilidade (Hu; He; Li, 2015).

Além da disponibilidade do antimônio por processos naturais, atividades antrópicas também determinam a presença do antimônio em todo meio ambiente seja em solos, rios e lagos ou fontes biogênicas (emissão de fontes naturais, sendo elas biológicas ou não) (Arai, 2010).

Atividades antrópicas com antimônio incluem sua utilização na medicina. O antimônio (Sb^{5+}) se apresenta como a principal droga no combate da leishmaniose há décadas (Rama; Kumar; Balaji, 2015), porém, o que determina o aumento de disponibilidade ambiental de antimônio é principalmente sua utilização industrial (Filella; Belzile; Chen, 2002).

Em 1950, a maior utilização industrial do antimônio consistia na produção de ligas metálicas (Nriagu, 2000). Atualmente estima-se que o consumo global de antimônio seja distribuído de acordo com o gráfico da figura 1.

Figura 1 – Distribuição do consumo global de antimônio.



Fonte: (modificado de He *et al.*, 2019)

Atualmente a maior utilização deste metaloide destina-se ao antimônio sob a forma Sb_2O_3 , empregado como sinergista na fabricação de materiais retardantes de chama (He *et al.*, 2019). Contudo, o antimônio também é amplamente utilizado em baterias de chumbo-ácido para melhorar a resistência à corrosão dos eletrodos, pois a morfologia microestrutural resultante (fortemente associada ao conteúdo de antimônio e à taxa de resfriamento) tem um papel importante no comportamento eletroquímico das ligas Pb – Sb. Além disso, cerca de 2% a 8% da composição das balas de chumbo corresponde ao antimônio (Ozório; Rosa; Peixoto, Garcia, 2011).

O antimônio sob a forma de Sb_2O_3 também causa preocupação, devido sua utilização industrial como catalizadores em embalagens plásticas utilizadas no empacotamento de alimentos e acondicionamento de líquidos (Carneado; Hernández-Nataren; López-Sánchez; Sahuqiollo, 2015; Qiao *et al.*, 2018; Apesteguia, 2017; Andrade, 2018). Das embalagens utilizadas, o PET é um material térmico e fisicamente estável e reciclável, com baixa densidade. Além de ser amplamente utilizado para embalagens de alimentos e bebidas, também é utilizado para acondicionar refeições à prova de forno ou reaquecíveis. Essa utilização pode aumentar significativamente os conteúdos residuais de antimônio, pois são influenciados pela alta temperatura (Carneado; Hernández-Nataren; López-Sánchez; Sahuqiollo, 2015; Qiao *et al.*, 2018).

Garrafas de PET com água potável quando armazenadas em altas temperaturas (acima de 40°C), como nos baús de carros durante o verão também podem apresentar maior lixiviação de antimônio para o líquido acondicionado (Carneado; Hernández-Nataren; López-Sánchez; Sahuqiollo, 2015; Qiao *et al.*, 2018). Há relatos de que não só a temperatura mais elevada interfere no aumento de partículas de Sb_2O_3 presentes no líquido adjacente, mas também o tempo de contato e o pH mais baixo (Apesteguia, 2017; Andrade, 2018).

Esta utilização em larga escala tem aumentado o consumo e consequentemente a disponibilidade de antimônio no ambiente nas últimas décadas (Butterman; Carlin Junior, 2004). Sendo assim, a entrada de antimônio no meio ambiente decorrente de atividades humanas excede significativamente a de fontes naturais há várias décadas (Filella; Belzile; Chen, 2002; He *et al.*, 2019).

A preocupação em relação ao antimônio vem crescendo consideravelmente devido à emissão antrópica, responsável pelo marcante aumento da sua concentração no meio ambiente. Ásia e Europa são as duas maiores fontes de poluição, representando 57% e 24% do total das emissões globais, respectivamente. China, Estados Unidos e Japão são os três principais países emissores (Tian *et al.*, 2014).

A China, por exemplo, possui as maiores reservas de antimônio do mundo, com uma demanda de cerca de 100.000 toneladas por ano e também domina a mineração de antimônio (cerca de 78% da capacidade de produção global) (He *et al.*, 2012). Segundo o United States Geological Survey Resources Program (2020), esses valores atingiram seu máximo em 2011 com 150.000 tonelada. Portanto, a

China desempenha um papel importante nas emissões antrópicas globais de antimônio, resultando em níveis altos deste elemento, principalmente decorrente de atividade de mineração (He *et al.*, 2019). Vale considerar que as atividades de mineração exibem uma influência notável no nível de concentração de antimônio na água natural (Flakova *et al.*, 2012).

Diante dos riscos que o antimônio representa à saúde humana e ao meio ambiente, o Ministério da Saúde e o Conselho Nacional de Meio Ambiente do Brasil estabeleceram limites normativos para a sua concentração máxima permissível (CMP) em águas tratadas, subterrâneas e mananciais, respectivamente, nas seguintes legislações: Portaria MS Nº 2914/2011, Resolução CONAMA 357/2005 e Resolução CONAMA 396/2008. Internacionalmente, já existe a preocupação com antimônio, por diversos órgãos reguladores e agências de saúde, como a Organização Mundial da Saúde do inglês *World Health Organization* (WHO, 2003) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *Environmental Protection Agency* (EPA). É possível comparar os níveis de antimônio em ambientes naturais e contaminados e as CMP no quadro de informações a seguir.

Quadro 1 – Quadro de informações. Níveis totais de antimônio em ambientes naturais e contaminados e valores de concentração máxima permitida (CMP).

Meio	Concentração	Referências	CMP	Fonte
Água natural	> 1 ug/L (0,003 uM)	SHOTYK e KRACHLER, 2007; MIHUCZ e ZÁRAY, 2016		Ministério da Saúde BRASIL, 2005
Água envasada	até 3,3 ug/L (0,01 uM)	ANDRADE, 2018	5 ug/L (0,01 uM)	
Água contaminada	até 30 mg/L (102 uM)	HE et al., 2012; CIDU et al., 2014		
Garrafa PET	até 435mg/kg (1.492 uM)	ANDRADE, 2018	350 mg/kg (1.200 uM)	BfR, 2011
Solo Natural	até 8,6 ug/kg (0,02 uM)	SHOTYK e KRACHLER, 2007; MIHUCZ e ZÁRAY, 2016	2 mg/kg (6,86 uM) 5 mg/kg (17,15 uM)	CONAMA 420/2009 Valores orientadores para solo - estado de São Paulo CETESB DD 256/2016/E
Solo contaminado	39,3 ¹ mg/Kg (134 uM)	HE et al., 2019		
	324 ² mg/kg (1.111 uM)		10 mg/kg (34,30 uM)	
	4.400 ³ mg/kg – (15.093 uM)		25 mg/kg (87,75 uM)	
	67,2 ⁴ mg/kg – (230uM)			

Fonte: A autora

Notas: ¹ Floresta sobre influência de atividades de fundição.

² Solo agrícola próximo a atividades de mineração.

³ Concentração total de antimônio em Mina.

⁴ Antimônio biodisponível.

A contaminação da água ou solo por antimônio pode causar consequências adversas na cadeia alimentar humana, em água potável, bem como na produtividade das culturas agrícolas. Comparando o acúmulo de antimônio em mudas de trigo cultivadas no solo e na água, foi possível encontrar grandes

quantidades de antimônio principalmente nas raízes devido sua interação direta com o solo. Adicionalmente, a absorção de antimônio pelas plantas cultivadas em água foi significativamente maior do que pelas plantas cultivadas no solo (Shtangeeva *et al.*, 2014). Ning e colaboradores (2015) descobriram que, apesar da porção de antimônio biodisponível ser baixa (inferior a 5%), sua concentração ainda pode chegar a valores altos devido às altas concentrações totais.

Quanto à concentração máxima permitida de antimônio em garrafas PET, um estudo realizado no Brasil, com amostras do Paraná e Santa Catarina determinaram a quantidade de antimônio presente nas embalagens e o maior valor de antimônio encontrado foi de 435,85 mg/kg (Andrade, 2018). No entanto, resinas plásticas como o PVC, PET e uma variedade de objetos plásticos que são usados nas atividades humanas diárias podem conter mais de 1000 mg/kg de antimônio (Turner; Filella, 2020), onde o recomendado seria 350 mg/kg segundo legislação da Alemanha, única recomendação do teor total de antimônio em garrafas PET encontrada na literatura (BRF, 2011).

No estudo de Andrade (2018) também foi possível calcular o valor de Ingestão Crônica Diária (IDC), e o maior valor calculado foi de 507,2 ng/kg/dia. O limite de IDC estabelecido pela OMS (WHO, 2003) é de 6000 ng/kg/dia. Já a EPA determina a IDC máxima em 400,0 ng/kg/dia. Portanto, as amostras de água envasada em PET no Brasil, podem apresentar concentrações abaixo ou acima do limite estabelecido, dependendo da legislação a ser considerada.

De qualquer forma, esses dados indicam que o uso do PET como material para embalagens de envase podem reduzir a qualidade da água brasileira, já que a espécie mais tóxica Sb^{3+} pode ser lixiviada (Andrade, 2018).

3.2 TOXICIDADE DO ANTIMÔNIO

Alguns fatores determinantes na descrição do antimônio na natureza, como detecção, quantificação, especificação e seu potencial tóxico frente à exposição humana, continuam pouco compreendidos. Entretanto sabe-se que a contaminação do ar, solo, água ou alimentos por antimônio pode gerar toxicidade e ser um risco à saúde humana (Belzile; Chen; Filella, 2011; Hereth; Vithanage; Bundschuh, 2017). Atualmente, o Sb_2O_3 é considerado possivelmente cancerígeno para os seres

humanos (Grupo 2B) segundo a Agência nacional de Pesquisa do Câncer, do inglês – *International Agency for Research on Cancer* (IARC).

No ar contaminado, pequenas partículas de compostos de antimônio com baixa solubilidade em água, como é o caso do Sb_2O_3 , são retidas nos pulmões por um período mais longo do que aqueles que contêm partículas maiores com maior solubilidade em água como, por exemplo, partículas de tartarato de antimônio (He; Wang; Wu; Fu, 2012). A toxicidade gerada por exposição inalatória pode causar irritação respiratória, pneumoconiose, manchas na pele e sintomas gastrointestinais (Sundar; Chakravarty, 2010; Pierart; Shahid; Sejalon-Delmas; Dumat, 2015). Outros efeitos respiratórios incluem bronquite crônica, enfisema crônico, tuberculose inativa e aderências pleurais, principalmente em exposições decorrentes de atividades ocupacionais (Sundar; Chakravarty, 2010).

Segundo o Centro Nacional de Informações de Biotecnologia, do inglês – *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – trabalhadoras expostas ao antimônio sofreram uma incidência maior de abortos espontâneos do que um grupo controle de trabalhadoras não expostas. Houve taxas mais altas de abortos espontâneos tardios (12,5% versus 4,1%) partos prematuros (3,4% versus 1,2%) e problemas ginecológicos (77,5% versus 56%) entre as trabalhadoras metalúrgicas expostas a aerossóis de antimônio. As amostras de ar continham poeira metálica, Sb_2O_3 e pentassulfeto, mas concentrações de antimônio não foram especificadas, assim como a idade e o tempo de exposição (NCBI, 2020).

A exposição mais intensa, embora relatada em menor frequência, resultou em sintomas como cólicas abdominais, náusea, vômito, diarreia, sabor metálico, dispnéia e perda de peso. Pode ocorrer perfuração do septo nasal e sangramentos nasais. Os trabalhadores de fundições expostos ao Sb_2O_3 frequentemente se queixavam de sintomas relacionados à irritação da membrana mucosa, como rinite (com casos de perfuração septal e perda de olfato), faringite, laringite (às vezes com afonia), gastroenterite, bronquite e pneumonite (NCBI, 2020).

A toxicidade por antimônio também pode ocorrer por ingestão de alimentos e água contaminados. Nesse caso, além da contaminação direta, pode ocorrer a ingestão indireta do antimônio através do Sb_2O_3 presente em embalagens utilizadas no empacotamento de alimentos ou envase de água mineral. O Sb_2O_3 pode migrar da resina para o alimento ou líquido acondicionado, aumentando os riscos de exposição e intoxicação humana (Sundar; Chakravarty, 2010).

Nos estudos de caso relatados pelo NCBI, há um exemplo de contaminação indireta que ocorreu com setenta pessoas que adoeceram após ingerir limonada de preparações deixadas durante a noite em baldes de esmalte branco (o esmalte continha 2,88% de Sb_2O_3). O Sb_2O_3 havia sido lixiviado do esmalte pela limonada ácida. Cinquenta e seis pessoas foram hospitalizadas, sofrendo de dores de estômago, cólicas, náuseas e vômitos. A análise descobriu que a limonada continha 0,013% de antimônio. Segundo o artigo, cada pessoa que ingerisse 300 ml de limonada receberia 36.000 ug de antimônio. Por meio desses valores é possível verificar que seria o equivalente a 109.100 ug/L (374 uM). O Sb_2O_3 pode ser absorvido pelo organismo principalmente pela derme, por inalação, pelo trato gastrointestinal e órgãos altamente vascularizados (ATSDR, 1992; Costa, 2016).

Compostos de antimônio, principalmente em altas concentrações, também são considerados fonte de contaminação clastogênica (por meio de quebra cromossomal) e contaminação genotóxica (Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017). Dados controversos sobre a mutagenicidade, genotoxicidade e clastogenicidade do antimônio já foram relatados.

Hext e colaboradores (1999) e Omura e colaboradores (2002) realizaram experimentos *in vivo* com roedores para testar a toxicidade antimônio sob a forma de Sb_2O_3 e demonstraram que o composto possui natureza inerte. Quando administrado de forma crônica, por períodos de até 90 dias com doses que chegam a 1686 mg/kg de massa corporal, o Sb_2O_3 não causou diferença no crescimento, alimentação, parâmetros espermáticos e ausência de sinais clínicos ou mudanças histológicas (Hext; Pinto; Rimmel, 1999). Elliott e colaboradores em 1997 e Kirland e colaboradores em 2007, relataram que a exposição crônica a doses de 1000 mg/kg de massa corporal não relatou morte, efeitos clastogênicos ou genotóxicos em roedores. Entretanto, Gurnani e colaboradores (1992) relataram que a exposição crônica de 21 dias induziu aberrações cromossômicas na medula óssea e foi letal aos animais no vigésimo dia de tratamento.

Quando avaliada a interferência do Sb_2O_3 sobre o sistema endócrino e reprodutivo em roedores, não foram observados efeitos de disfunção endócrina (anti) estrogênica ou (anti) androgênica, mas danos histológicos em tireóide e testículos (como necrose folicular) foram comuns frente à exposição ao Sb_2O_3 . Também foi relatado possíveis danos neurológicos, com alteração da homeostase especialmente hepática e renal e alteração no equilíbrio oxi-redutor. Isso demonstra

que, embora o Sb_2O_3 não tenha propriedades desreguladoras endócrinas, ele possui efeitos tóxicos sobre o organismo de roedores como um todo (Costa, 2016).

Em humanos um possível efeito genotóxico foi observado na forma de danos no DNA em trabalhadores expostos ao Sb_2O_3 em relação ao grupo controle, havendo um aumento nas regiões apurínico/apirimidínico (AP) (Shanawany *et al.*, 2017). Também foi demonstrado que níveis de IgA, IgG e IgE podem ser negativamente associados a exposição ao composto (Wu; Chen, 2017).

O antimônio sob a forma de Sb_2O_3 também é considerado um agente de caráter citotóxico. As espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas, devido a forte ligação de Sb^{+3} e Sb^{+5} com grupos – SH presentes em muitas proteínas. As formas trivalentes de Sb, em especial seu óxido Sb_2O_3 , quando em solução aquosa de pH entre 2,7 a 10,4, normalmente se apresentam na forma de $\text{Sb}(\text{OH})_3$, nessa composição química não apresentam carga elétrica e possuem características lipofílicas. Essa característica permite facilmente sua passagem através de membranas celulares. Isso pode explicar a razão pela qual o Sb^{+3} exerce toxicidade aguda 10 vezes maior que o Sb^{+5} (Filella; Belzile; Chen, 2002; Zotov; Shikina; Akinfiyev, 2003; Ungureanu; Santos; Boaventura; Botelho, 2015).

Também ocorrem diferenças entre as espécies de antimônio em relação à afinidade por células e grupos químicos. Pode-se citar como exemplo, a maior afinidade que o Sb^{+3} apresenta pelos grupos sulfidrilas livres dentro de proteínas, tais como glutathione (GSH) e Cys (Haldar; Sem; Roy, 2011) e por células vermelhas (eritrócitos), provavelmente pela interação com seus constituintes (Edel; Marafante; Sabbioni; Manzo, 1983; Gebel, 1998; Krachler; Emons; Zheng, 2001).

Um dos modos de ação propostos para o antimônio nas células é a inibição do metabolismo energético e da biossíntese de macromoléculas, através da inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos. Os alvos específicos ainda não foram identificados, mas a hexocinase, a fosfofructo-quinase e o piruvato-quinase foram eliminados quanto possíveis candidatos. Além disso, já foi demonstrado que o antimônio afeta a capacidade tamponante dos grupamentos tíois intracelulares e o potencial redox de células (Wyllie; Cunningham; Fairlamb, 2004).

A exposição ao antimônio pode afetar as células por induzir estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo é causado pela exposição a oxigênio reativo intermediário, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), que pode

danificar proteínas, ácidos nucleicos e membranas celulares. O estresse oxidativo é um subproduto inevitável da atividade aeróbica, porque oxigênio (O_2) e H_2O_2 são formados sempre que o oxigênio molecular oxida quimicamente os portadores de elétrons (Storz; Imlay, 1999). Porém, o estresse oxidativo também está associado a inúmeras exposições ambientais, incluindo, fumaça de cigarro, poluição, luz ultravioleta, pesticidas, metais e metaloides tóxicos, onde se inclui o Sb_2O_3 (Aseervatham, Sivasudha; Jeyadevi; Arul, 2013; Baltazer *et al.*, 2014; Poljsak; Fink, 2014).

Al-gubory (2014) e Phaniendra e colaboradores (2015) relataram que o estresse oxidativo causado pela produção de EROs pode ser o principal mecanismo subjacente à toxicidade por Sb_2O_3 nas células. Esta citotoxicidade pode levar a apoptose em uma série de linhagens celulares mielogênicas, linfáticas e embrionárias conforme ilustrado na Tabela 1 (Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2016; Verdugo; Ogra; Quiroz, 2016).

Tabela 1 – Estudos de citotoxicidade utilizando Sb.

Autores	Células expostas ao Sb
Mann <i>et al.</i> , 2006	NB4 / HELA / PLB-985 / APL
Losler <i>et al.</i> , 2009	HL-60 / K-562 / LOUCY / CCRF-CEM
Jiang <i>et al.</i> , 2016	HEK-293
Verdugo <i>et al.</i> , 2016	HEK-293

Fonte: A autora

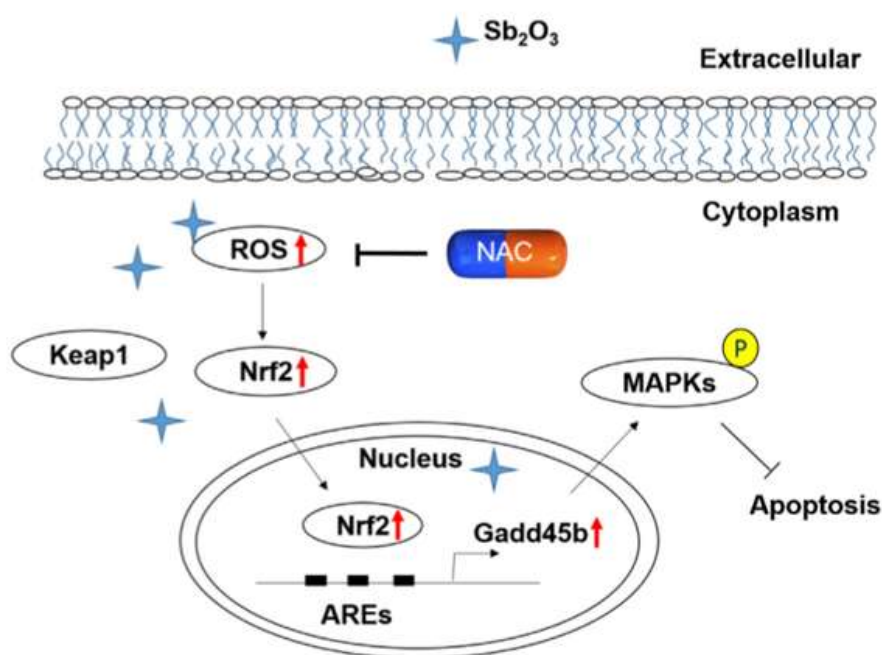
Foi relatada a ativação da via de sinalização SEK1/JNK em linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda (LPA) submetidas ao tratamento com Sb_2O_3 (Mann *et al.*, 2006). c-Jun cinases N-terminais (JNK) pertencem à família das proteínas cinase ativadas por mitógenos e respondem a estímulos, como o estresse induzido por Sb_2O_3 . Sua atividade pode ser modulada por outra proteína cinase, a proteína SEK 1. Uma ativação da via de sinalização JNK é frequentemente associada ao mecanismo de apoptose desencadeada por EROs (Lin, 2003).

Em contrapartida, um dos mecanismos de proteção celular contra o estresse oxidativo e apoptose induzido por Sb_2O_3 foi relatado por Jiang e colaboradores (2016) com a ativação da via de sinalização Nrf2-Keap1 e via de sinalização gadd45b. Nrf2 é um fator transcricional antioxidante que protege as

células do dano induzido por EROs através da modulação da expressão de genes citoprotectores e antioxidantes como é o caso do gene *GADD45B* (Li; Kong, 2009; Ma, 2013). Os membros da família de genes *Gadd45b*, incluindo, *Gadd45*, *Gadd45a*, e *Gadd45r*, foram comumente implicados na sinalização do estresse em resposta a estressores fisiológicos ou ambientais, resultando em prisão do ciclo celular, reparo do DNA, sobrevivência celular e apoptose (Salvador; Brown-Clay; Fornace Junior, 2013). *Gadd45b* foi implicado como um fator anti-apoptose através da via de MAPKs de ativação na resistência à apoptose, iniciado por uma variedade de estímulos (Yang; Song; Huang, 2009; Ou *et al.*, 2010; Salerno; Tront; Hoffmann; Liebermann, 2012; Yoo *et al.*, 2003).

Os dados de Jiang e colaboradores (2016) ressaltaram um papel crucial do Nrf2-*Gadd45b* na modulação da morte celular apoptótica induzida por estímulo aos metalóides como o Sb. Esses achados não só significaram uma nova característica de toxicidade sob exposição ao Sb_2O_3 , mas também implicaram uma medida de proteção significativa contra a exposição ao antimônio (Jiang *et al.*, 2016). Além disso, foi demonstrado que o estresse oxidativo gerado pelo Sb_2O_3 pode ser controlado por moduladores do sistema redox como a glutathiona celular e butionina sulfoximina (BSO) (Lösler *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2016). A Representação esquemática do mecanismo subjacente ao eixo de sinalização Nrf2-*Gadd45b* como papel protetor na apoptose celular induzida por Sb_2O_3 pode ser observada na figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo subjacente ao eixo de sinalização Nrf2-Gadd45b como papel protetor na apoptose celular induzida por Sb_2O_3 .

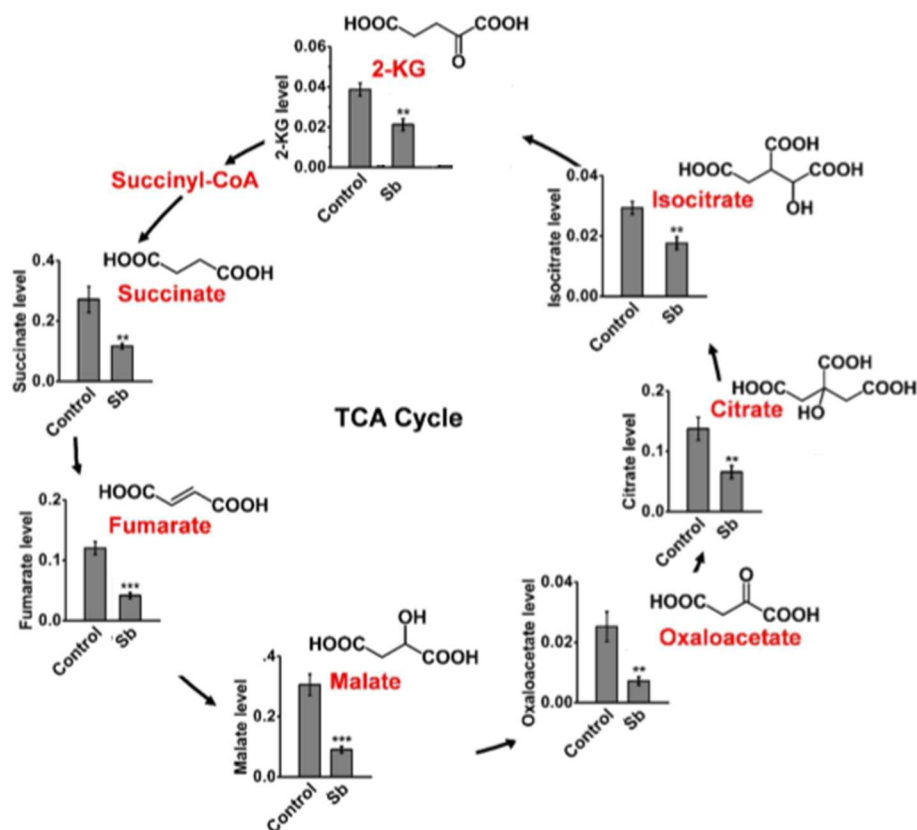


Fonte: (Jiang *et al.*, 2016)

A produção excessiva de EROs por Sb_2O_3 também pode gerar danos no DNA, peroxidação lipídica e modificações proteicas indesejadas aumentando o risco de numerosas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios neurológicos (Jomova; Valko, 2011; Shanawany *et al.*, 2017).

Koch e colaboradoras (2017) demonstraram que o antimônio afeta negativamente o reparo de quebra de duplas fitas de DNA (DNA – DSB) e no ciclo celular, afetando a fosforilação do ponto de verificação quinase 1 (Chk1) podendo levar a célula a apoptose. Foi demonstrado também que antimônio pode exercer toxicidade celular comprometendo características epigenéticas por meio de modificações da citosina no DNA e RNA e redução no conteúdo de metabólitos que ocorre no ciclo do ácido tricarboxílico, conforme ilustrado na figura 3 (Xiong *et al.*, 2017).

Figura 3 – Redução dos níveis dos metabólitos TCA por antimônio.



Fonte: Adaptado de (Xiong *et al.*, 2017)

O antimônio é um composto encontrado em todo o ambiente e segundo estudos pode causar toxicidade aguda ou crônica (Sundar; Chakravarty, 2010; Jomova; Valko, 2011; Pierart; Shahid; Sejalon-Delmas; Dumat, 2015; Shanawany *et al.*, 2017; Wu; Chen, 2017). Com aumento da contaminação ambiental e da exposição humana ao Sb_2O_3 , consequência de seu crescente uso como sinergista em retardantes de chamas e na catálise de polímeros plásticos, se torna essencial entender o potencial citotóxico do mesmo (Filella; Belzile; Chen, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desse composto sobre a dinâmica celular. Perante o exposto, o objetivo principal do presente trabalho é avaliar a exposição de diferentes linhagens celulares ao Sb_2O_3 sobre diferentes concentrações e tempos de exposição.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Para avaliar a atividade citotóxica do Sb_2O_3 foram utilizadas linhagens celulares de fibroblasto de camundongo (3T3), estabelecidas a partir de células fibroblásticas embrionárias desagregadas de cultura de embriões de camundongos (Swiss) como parâmetro de célula não tumoral. Células tumorais de adenocarcinoma humano (HeLa) derivada de um carcinoma cervical, foram utilizadas para uma análise comparativa. Com o intuito de testar a capacidade citotóxica do Sb_2O_3 em células de origem nervosa foram utilizadas células de feocromocitoma de rato (PC12), derivadas de glândula adrenal; Células de neuroblastoma murino (Neuro-2a), estabelecidas a partir de células de neuroblasto em tecido cerebral e células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), derivadas de uma linhagem celular subclonada, originária de células tumorais provenientes da medula óssea, retiradas de um neuroblastoma de uma criança com 4 anos (ATCC).

Todas as linhagens celulares foram mantidas por meio de repiques semanais em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*- Gibco) contendo penicilina (100 ul/ml) e estreptomicina (100 ug/L) – Gibco e o agente tamponante - ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanossulfônico) - (HEPES) - 2,5 g/L – (Sigma-Aldrich).

A solução foi suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e as células mantidas a 37°C em 5% CO_2 , conforme as especificações contidas na *The American Type Culture Collection* (ATCC).

4.2 DILUIÇÃO DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (Sb_2O_3)

O Sb_2O_3 , é praticamente insolúvel em água (28,7 mg/L a 20°C) (SIGMA-ALDRICH, 2020), portanto, foi primeiramente dissolvido em ácido clorídrico (HCl) fumegante 37% como descrito por Lösler e colaboradores (2009), resultando em uma solução estoque de 0,25 M.

Para os tratamentos com as células, a solução de 0,25 M de Sb_2O_3 em HCl foi diluída em meio DMEM sem soro fetal bovino para obter-se a solução de maior concentração a ser usada. Então, foram realizadas diluições seriadas para obter-se

as demais concentrações utilizadas nos tratamentos, sempre usando para diluição meio DMEM sem soro fetal bovino. As soluções com diferentes concentrações usadas nos tratamentos das células eram preparadas momentos antes da realização dos experimentos.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO Sb_2O_3

4.3.1 Ensaio de redução com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade do Sb_2O_3 , 2×10^4 células de neuroblastomas (Neuro-2a, SH-SY5Y) e de feocromocitoma (PC12) foram semeadas em placas de 96 poços, em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino, bem como, $1,5 \times 10^4$ células da linhagem celular de HeLa. As células foram mantidas nestas condições por 24 horas, a 37°C , em estufa a 5% CO_2 . O mesmo procedimento foi realizado com a linhagem celular de 3T3, com plaqueamento de 1×10^4 . O número de células foi específico para cada tipo celular considerando o tempo médio de reprodução e a disposição ideal das células, sem que houvesse a falta ou excesso de células na placa.

Após 24 horas, o meio de cultivo foi removido e aos poços foi acrescentada a solução de DMEM, sem soro fetal bovino, contendo diferentes concentrações de Sb_2O_3 (de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM). As células foram tratadas por 24 e 48 horas.

Foram realizados, também, experimentos com as concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 25 e 32 μM de Sb_2O_3 para 24, 48, 72, 96 e 120 horas, totalizando cinco dias de exposição, em células HeLa e SH-SY5Y.

Como controle veículo, foi utilizado para diluir o Sb_2O_3 , um volume de ácido clorídrico fumegante 37%, equivalente a maior concentração do tratamento com Sb_2O_3 (128 μM). A solução foi diluída em meio DMEM, sem soro fetal bovino, e utilizado para tratamento das células, denominado como grupo controle do experimento. O grupo controle tem a finalidade de demonstrar que se caso o Sb_2O_3 promovesse algum efeito para as células, era decorrente da toxicidade do composto e não da presença do HCl utilizado na diluição do Sb_2O_3 em razão da alteração de pH que o HCl poderia causar.

Para retirar a interferência de absorbância que o próprio composto pode causar, a solução de maior concentração preparada de Sb_2O_3 (128 μM) foi adicionada aos poços que não possuíam células, esse controle foi denominado de branco.

Após o período de exposição ao Sb_2O_3 , o meio de cultivo contendo os tratamentos foi removido e 50 μL de uma solução contendo o reagente MTT (0,5 mg/ml, Sigma Aldrich) foi adicionado a cada poço e as linhagens incubadas por 3 horas a 37 °C em 5% CO_2 . Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) em cada poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes (precipitados de cor arroxeada formados a partir da redução do reagente amarelo, MTT, por células viáveis).

A absorbância foi mensurada em 570 nm, em leitora de microplacas Biotek Elx800. Foram realizados 3 ou mais ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. A viabilidade celular foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Média da Absorbância das amostras} - \text{média do branco})}{(\text{Média da Absorbância dos controles} - \text{média do branco})} \times 100$$

4.3.2 Determinação do CI_{50}

Os resultados de viabilidade celular obtidos nos ensaios de MTT foram utilizados para o cálculo da concentração inibitória mínima, o CI_{50} das células tratadas, expressando-se a citotoxicidade pela concentração da amostra que reduziu a viabilidade celular em 50%. O CI_{50} foi calculado a partir de uma curva de regressão não linear onde o eixo X era constituído pelas concentrações de tratamento em escala logarítmica e o eixo Y as porcentagens de viabilidade celular. Foi utilizado o programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) seguindo tutorial fornecido pela GraphPad Software (<https://www.graphpad.com/support/faq/how-to-determine-an-icsub50sub/>).

4.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS TRATADAS COM Sb_2O_3 POR MAY GRUNWALD-GIEMSA

A coloração de May Grunwald-Giemsa é uma coloração policromática do tipo Romanowski, uma combinação dos métodos de May-Grunwald e de Giemsa, também chamada de coloração de Pappenheim ou Romanowski-Giemsa. É a coloração de referência na hematologia, na citopatologia e na histologia (Witteking, 1983). Distingue a cromatina, citoplasma, grânulos citoplasmáticos e outras estruturas celulares, por isso é usada para observar a morfologia celular. Apesar de na prática existirem muitas variações, basicamente o corante May-Grunwald é composto pela eosina Y, um corante ácido, e pelo azul de metileno, um corante básico, enquanto no corante Giemsa encontra-se o azure B (uma forma oxidada do azul de metileno) (Witteking, 1983). Dois tipos celulares foram selecionados para a realização desse procedimento: Células SHSY-5Y devido a resistência apresentada no tratamento com Sb_2O_3 e células HeLa como parâmetro comparativo. Este procedimento foi realizado após o tratamento com diferentes tempos e concentrações de Sb_2O_3 .

O plaqueamento foi feito sobre a lâmina circular, com densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço com meio DMEM suplementados com 10% de SFB. As placas foram armazenadas em incubadora de CO_2 a 5% a 37°C . Após 24 horas, o meio foi removido e em seguida adicionado meio DMEM, sem soro fetal bovino, com as devidas concentrações de Sb_2O_3 . As concentrações foram específicas para cada tipo celular, considerando a concentração de citotoxicidade intermediária para cada uma das linhagens, determinada previamente por MTT.

Após 24 horas o tratamento foi removido e as células lavadas com uma solução tampão fosfato-salino - PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) contendo 137 mM de Cloreto de Sódio (NaCl), 2,6 mM de Cloreto de Potássio (KCl), 10 mM de Fosfato de Sódio Bifásico (Na_2HPO_4) e 1,76 mM de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4).

As células foram fixadas com uma solução de 2% de formol diluído em PBS por 10 minutos, então, submetidas à coloração hematológica clássica de May Grunwald-Giemsa. Após a coloração as lâminas foram lavadas com água destilada e montadas sobre lâminas de vidro e seladas com esmalte. As células foram analisadas em microscopia convencional utilizando objetiva de imersão em

microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com câmera digital acoplada Olympus DP-71, 12 megapixels, utilizando o programa DP controller para o registro das imagens.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software estatístico GraphPadPrism versão 7.00 para Windows (San Diego, CA, EUA). Para os ensaios de citotoxicidade os resultados obtidos foram submetidos ao teste de distribuição normal de Shapiro-Wilk e Bartlett. Como todos seguiram uma distribuição normal, foram posteriormente avaliados por análise de variância (ANOVA de uma via), seguido de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para determinação dos valores de CI_{50} , seguiu-se o tutorial disponibilizado pelo software, de modo que os cálculos foram obtidos a partir de uma curva de regressão não-linear, onde o eixo X era constituído pelas concentrações de tratamento em escala logarítmica e o eixo Y as % de viabilidade celular, como descrito no item 4.3.2.

5 RESULTADOS

Neste estudo, a citotoxicidade de Sb^{3+} foi avaliada usando o seu óxido, Sb_2O_3 , pois é a maior fonte de antimônio no ambiente natural e o principal composto utilizado industrialmente como catalizador de polímeros plásticos e como sinergista em retardadores de chama, responsável pelos elevados níveis de antimônio no ambiente (Belzile; Chen; Filella, 2002; Buttermann; Carlin Junior, 2004; Brebu; Jakab; Sakata, 2007; ATSDR, 2011).

A utilização de Sb_2O_3 foi possível após a obtenção de soluções por meio da diluição em HCl-fumegante 37%, pois o índice de solubilidade de Sb_2O_3 , pode ser alterado em função da concentração de HCl (Hashimoto; Nishimura; Umetsu, 2003). Estudos realizados com o antimônio têm utilizado a diluição em HCl-fumegante 37% e posterior diluição em PBS como descrito por Lösler (2009).

Para condução do presente estudo, o Sb_2O_3 foi diluído em HCl-fumegante 37% para a obtenção da solução de 0,25 M de Sb_2O_3 e, a partir dessa solução estoque, foram feitas as diluições em meio DMEM contendo o agente tamponante HEPES. Testes preliminares demonstraram que a diluição da solução estoque em PBS gerava precipitados em concentrações acima de 32 μM , fato esse que não aconteceu ao empregar a diluição em meio DMEM. Além disso, após a diluição da solução estoque em meio DMEM, a solução final obtida não teve o pH alterado ao ponto de interferir na viabilidade celular., contudo, as alterações que envolvem processos químicos entre o Sb_2O_3 , a solução de HCl e o meio DMEM, dificultam a determinação exata do produto químico final de antimônio na solução.

5.1 CITOTOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO EM 24 E 48 HORAS.

Os experimentos realizados nesse trabalho buscavam investigar a capacidade citotóxica do antimônio sob a forma de Sb_2O_3 em tipos celulares distintos. Para tanto as células 3T3, HeLa, Neuro-2a, PC12 e SH-SY5Y foram expostas às concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM de Sb_2O_3 por 24 e 48 horas. As concentrações de Sb_2O_3 consideradas relevantes para os experimentos incluem aquelas descritas na literatura - entre 1 μM e 32 μM (Jiang *et al.*, 2016) e concentrações mais elevadas (64 μM , 128 μM) - compatíveis com valores

encontrados em ambientes contaminados (Tabela 1) e necessários para obtenção dos valores de CI_{50} principalmente em períodos curtos de exposição ao Sb_2O_3 (24 e 48 horas).

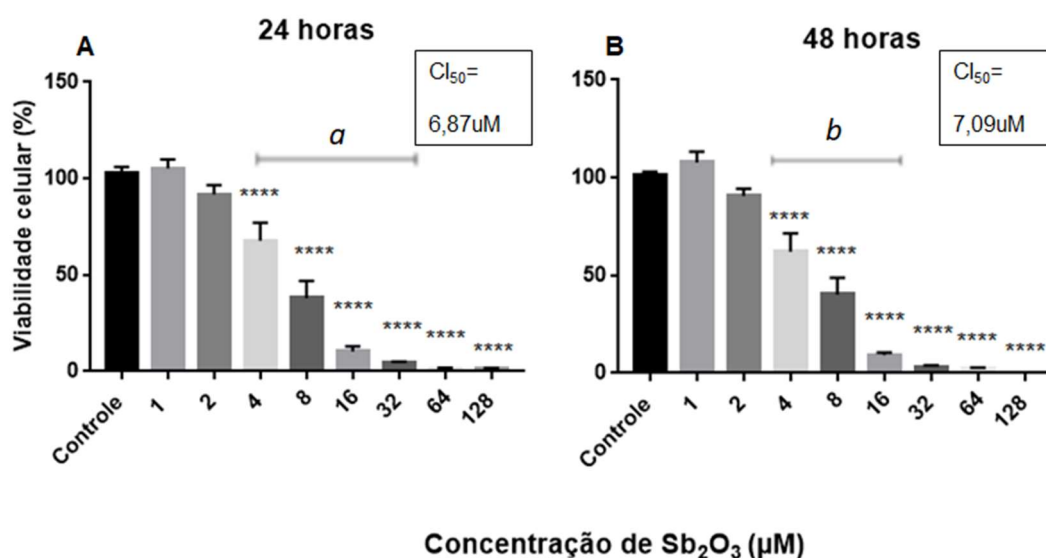
Visando determinar a toxicidade do Sb_2O_3 em célula não tumoral, células 3T3 foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de Sb_2O_3 durante 24 e 48 horas e avaliada segundo o teste colorimétrico MTT (Figura 2).

Houve a diminuição da viabilidade das células 3T3 quando expostas as concentrações de Sb_2O_3 acima de 4 μM , em 24 horas (Figura 2A) e 48 horas (Figura 2B).

Houve diferença estatística na viabilidade celular de forma dose-dependente entre as concentrações de 4 μM , 8 μM , 16 μM e 32 μM em 24 (a) e 48 horas (b). Em todas as concentrações acima de 16 μM houve redução de viabilidade superior a 90% no tempo de 24 e 48 horas.

A concentração necessária de Sb_2O_3 para reduzir a viabilidade celular em 50% (CI_{50}), para 24 horas, foi de $6,87 \pm 5,2$ e para 48 horas $7,09 \pm 3,2$. Entretanto, sem diferença estatística, sendo assim, para esta linhagem o tratamento com antimônio não foi dependente de tempo.

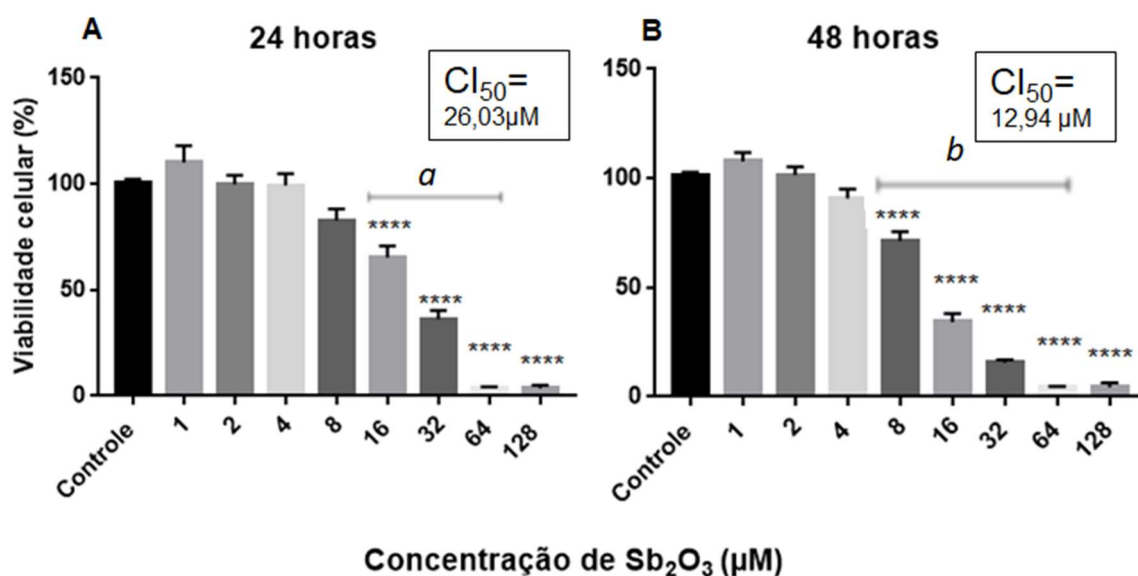
Figura 4 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células 3T3 em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, após 24(A) e 48(B) horas de exposição ao Sb_2O_3 . Cada barra representa a média $\pm$ o erro padrão da média, obtidos de quatro ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Letras (a) e (b) representam diferenças estatísticas entre as concentrações. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste pelo pós teste de Tukey. **** $P < 0,0001$ em relação ao controle.



O efeito de Sb_2O_3 sobre a viabilidade de células HeLa durante 24 e 48 horas está demonstrado na figura 3. Não houve citotoxicidade nas concentrações inferiores a 16 e 8 μM de Sb_2O_3 em 24 e 48 horas, respectivamente.

Foi possível observar aproximadamente 35% de redução de viabilidade em 24 horas e 65 % em 48 horas na concentração de 16 μM de Sb_2O_3 . A viabilidade celular diminuiu de forma dependente da dose e do tempo, em 24 horas (a) e em 48 horas (b). O CI_{50} foi de $26,03 \pm 3,13$ em 24 horas e $12,94 \pm 4,16$ em 48 horas.

Figura 5 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células HeLa em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, após 24(A) e 48(B) horas de exposição ao Sb_2O_3 . Cada barra representa a média $\pm$ o erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Letras (a) e (b) representam diferenças estatísticas entre as concentrações. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste pelo pós teste de Tukey. **** $P < 0,0001$ em relação ao controle.

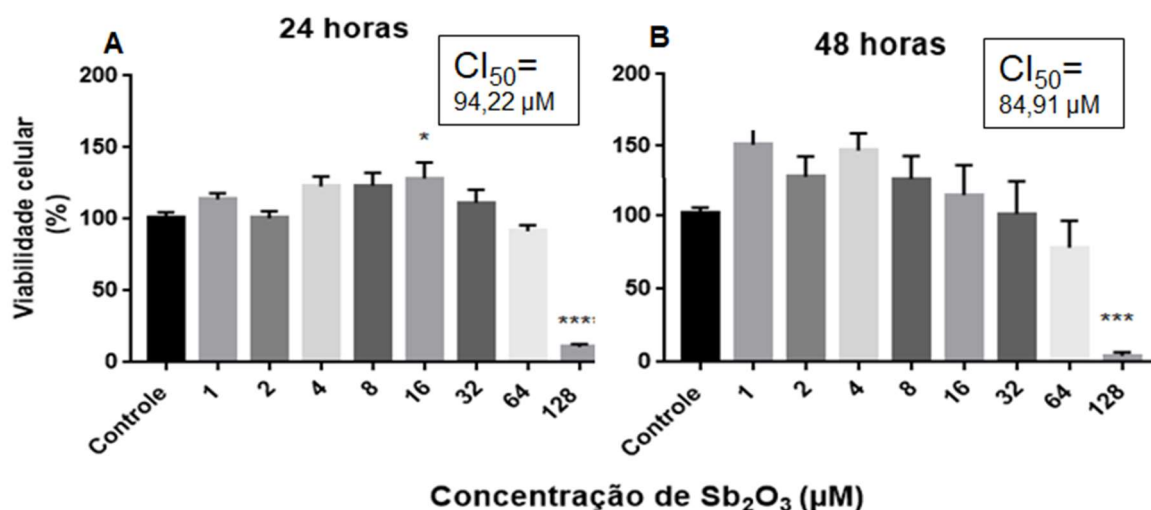


Fonte: A autora

Com o intuito de testar a capacidade citotóxica do Sb_2O_3 em células de origem nervosa, células Neuro-2a, PC12 e SH-SY5Y também foram submetidas ao tratamento com Sb_2O_3 .

Células PC12 tiveram sua viabilidade reduzida apenas na maior concentração testada (128 μM) em 24 e 48 horas (Figura 4), com redução de aproximadamente 90 e 95% de viabilidade celular, respectivamente. O CI_{50} em 24 horas foi de $94,22 \pm 3,6$ e $84,91 \pm 52,5$ em 48 horas. É possível observar também, um aumento na redução do MTT em 16 μM de Sb_2O_3 em 24 horas (Figura 4A).

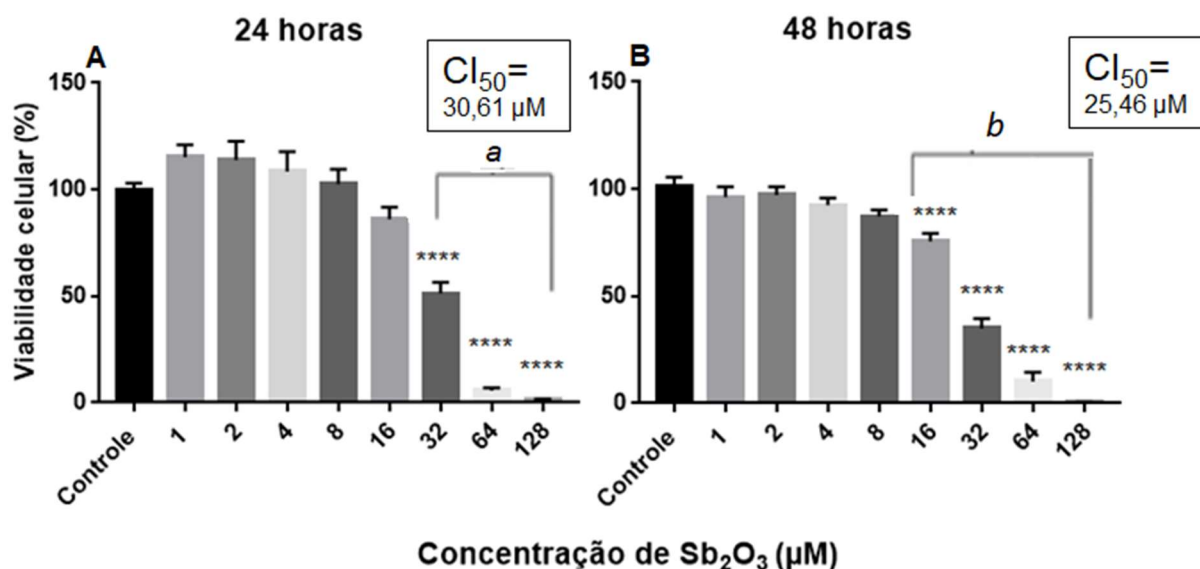
Figura 6 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células PC12 em diferentes concentrações por 24 e 48 horas. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao Sb_2O_3 nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM . Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós- teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle.



Fonte: A autora

Células Neuro-2a quando submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de Sb_2O_3 apresentaram citotoxicidade nas concentrações acima de 32 μM em 24 horas (Figura 5A) e acima de 16 μM em 48 horas (Figura 5B). Foi possível observar aproximadamente 40% e 60% de morte celular na concentração de 32 μM , em 24 e 48 horas, respectivamente. Independente do tempo de tratamento, não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de 64 e 128 μM . O CI_{50} da linhagem Neuro-2a foi de $30,61 \pm 10,56$ em 24 horas e $25,46 \pm 6,61$ em 48 horas, sem diferenças estatísticas entre esse tempo de tratamento.

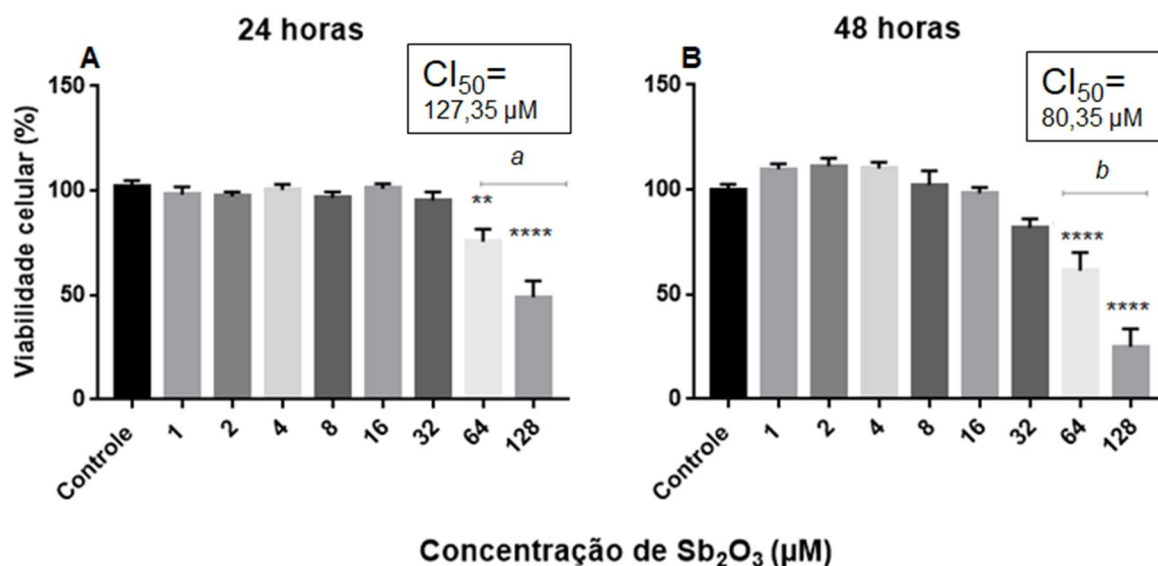
Figura 7 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade células Neuro-2a em diferentes concentrações e tempos de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após 24(A) e 48(B) horas de exposição ao Sb_2O_3 nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM . Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de cinco ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Letras (a) e (b) representam diferenças estatísticas entre as concentrações. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



Fonte: A autora

Quando células da linhagem SHSY-5Y foram tratadas com Sb_2O_3 nas mesmas concentrações usadas nos demais experimentos, apenas as concentrações de 64 e 128 μM apresentaram citotoxicidade contra células SH-SY5Y em 24 horas (Figura 6A) e 48 horas (Figura 6B). O valor de CI_{50} estimado para 24 horas foi de $127,35 \pm 1,02$ e $80,35 \pm 10,7$ para 48 horas. Os dados indicam 40% e 70% de redução na viabilidade na maior concentração (128 μM) em 24 e 48 horas, respectivamente. Devido à baixa suscetibilidade a concentrações menores, a linhagem celular SH-SY5Y foi ainda, submetida a concentrações mais elevadas de 150, 200, 250 e 300 μM em 24 e 48 horas (dados não mostrados).

Figura 8 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade de células SH-SY5Y com diferentes concentrações em 24 e 48 horas de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após 24(A) e 48(B) horas de exposição ao Sb_2O_3 nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 μM . Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de quatro ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Letras (a) e (b) representam diferença significativa entre as concentrações. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



Fonte: A autora

A citotoxicidade induzida por Sb_2O_3 pode ser comparada por meio dos valores da concentração inibitória mínima em 24 e 48 horas em cada linhagem celular testada. Os valores são apresentados na tabela 1.

Tabela 2 – Valores da concentração inibitória mínima (CI₅₀) de Sb_2O_3 , nas concentrações de 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM e 128 μM sobre diferentes linhagens celulares.

Linhagens Celulares	24H	48H
3T3	5,44 ± 5,2	5,63 ± 3,27
HeLa	26,03 ± 3,13	12,94 ± 4,16
Neuro 2-a	30,61 ± 10,56	25,46 ± 6,61
PC12	94,62 ± 3,6	84,91 ± 52,5
SH-SY5Y	127,35 ± 1,02	80,35 ± 10,71

Média ± desvio padrão de 3 ou mais experimentos independentes.

Fonte: A autora

5.2 CITOTOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR Sb_2O_3 EM CÉLULAS HELA E SH-SY5Y POR 24, 48, 72, 96 E 120 HORAS.

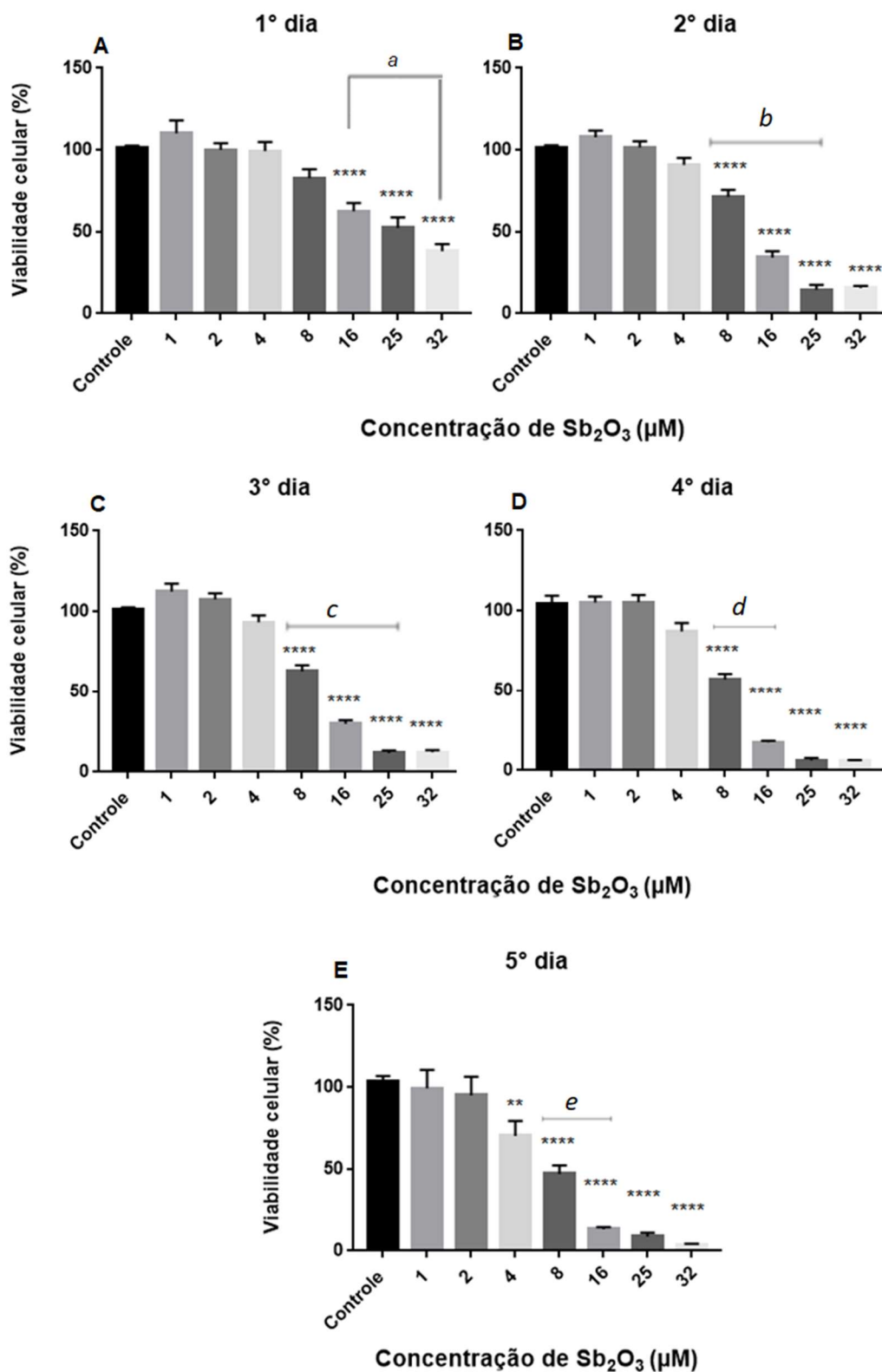
Com o intuito de testar a capacidade citotóxica do Sb_2O_3 em menores concentrações por um período maior, foi realizado a segunda fase de experimentos com HeLa e SH-SY5Y. Então, as células foram mantidas nas concentrações mais baixas de 1, 2, 4, 8, 16, 25 e 32 μM de Sb_2O_3 por 24, 48, 72, 96 e 120 horas, totalizando cinco dias de exposição.

Em células HeLa foi possível observar o efeito citotóxico do Sb_2O_3 nas concentrações a partir de 16 μM no primeiro dia (Figura 7). Do segundo ao quarto dia a viabilidade celular reduzida pode ser observada a partir de 8 μM (Figura 7B, 7C e 7D, respectivamente) e a partir de 4 μM no quinto dia (Figura 7E).

No primeiro dia de tratamento o efeito citotóxico do Sb_2O_3 ocorreu de forma dose-dependente em 16 e 32 μM , sem diferenças estatísticas entre as concentrações de 16 e 25 μM (a). O mesmo evento dose-dependente pode ser observado no segundo (b), terceiro (c), quarto (d) e quinto dia (e).

Na concentração de 32 μM , a viabilidade diminuiu gradualmente do primeiro ao quinto dia de exposição em aproximadamente 62%, 84%, 88%, 94% e 98%, respectivamente.

Figura 9 – Efeito do trióxido de antimônio sobre a viabilidade células HeLa em diferentes concentrações e tempos de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) e 120 (E) horas de exposição ao Sb_2O_3 . Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Letras (a), (b), (c), (d) e (e) representam diferenças estatísticas entre as concentrações. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



Fonte: A autora

Foi possível observar, também, que a concentração necessária de Sb_2O_3 para reduzir a viabilidade celular de 50% de células HeLa reduziu ao longo do tempo, indicando que a citotoxicidade induzida por Sb_2O_3 pode ser elevada em função do tempo de exposição, como pode ser observada na tabela 2.

Tabela 3 – Valores da concentração inibitória mínima (CI_{50}) de Sb_2O_3 , nas concentrações de 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 25 μM e 32 μM em células HeLa, de um a cinco dias de tratamento.

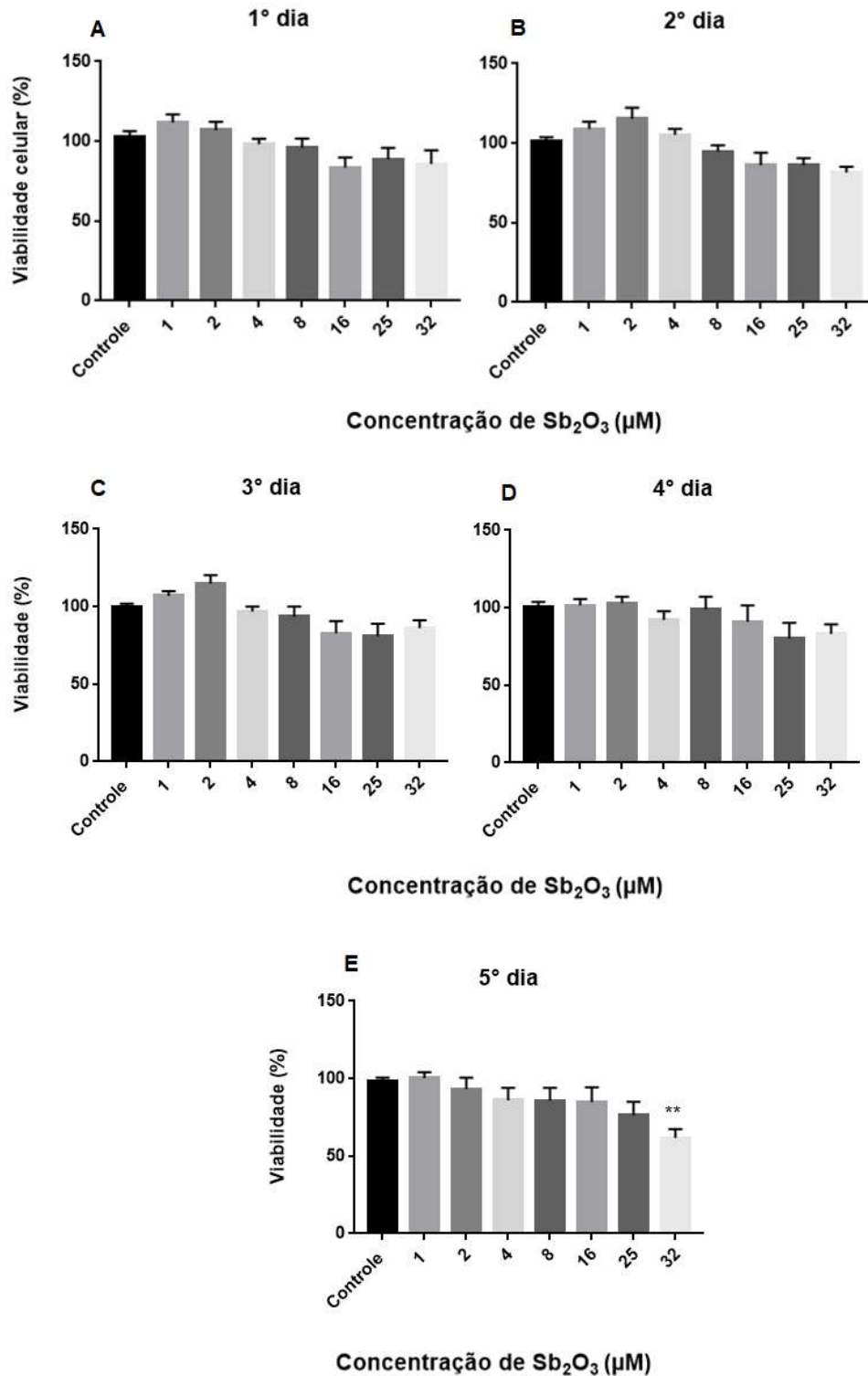
HeLa	CI 50
1° dia	24,43 $\pm$ 5,4
2° dia	12,16 $\pm$ 3,02
3° dia	9,931 $\pm$ 2,3
4° dia	7,925 $\pm$ 1,68
5° dia	4,637 $\pm$ 1,96

Médias $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes

Fonte: A autora

Em células SH-SY5Y, não foi possível observar redução de viabilidade celular de até o quarto dia de tratamento (Figura 8A, 8B, 8C e 8D) e consequentemente isso impossibilitou a obtenção dos valores de CI_{50} nestas condições de tempo, de tratamento e concentração de Sb_2O_3 . Os dados apresentados aqui mostram que o efeito citotóxico só ocorreu em concentração de 32 μM de Sb_2O_3 no quinto dia de tratamento (Figura 8E). A viabilidade celular diminuiu aproximadamente 40% na maior concentração e tempo de exposição.

Figura 10 – Efeito do trióxido de antimônio sobre células SH-SY5Y em diferentes concentrações e tempos de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) e 120 (E) horas de exposição ao Sb_2O_3 em menores concentrações (1, 2, 4, 8, 16, 25 e 32 μM). Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por ensaio. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação ao controle.



Fonte: A autora

5.3 ENSAIO DE ANÁLISE MORFOLÓGICA COM MAY GRUNWALD-GIEMSA NAS LINHAGENS CELULARES DE ADENOCARCINOMA HUMANO (HELA) E NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y).

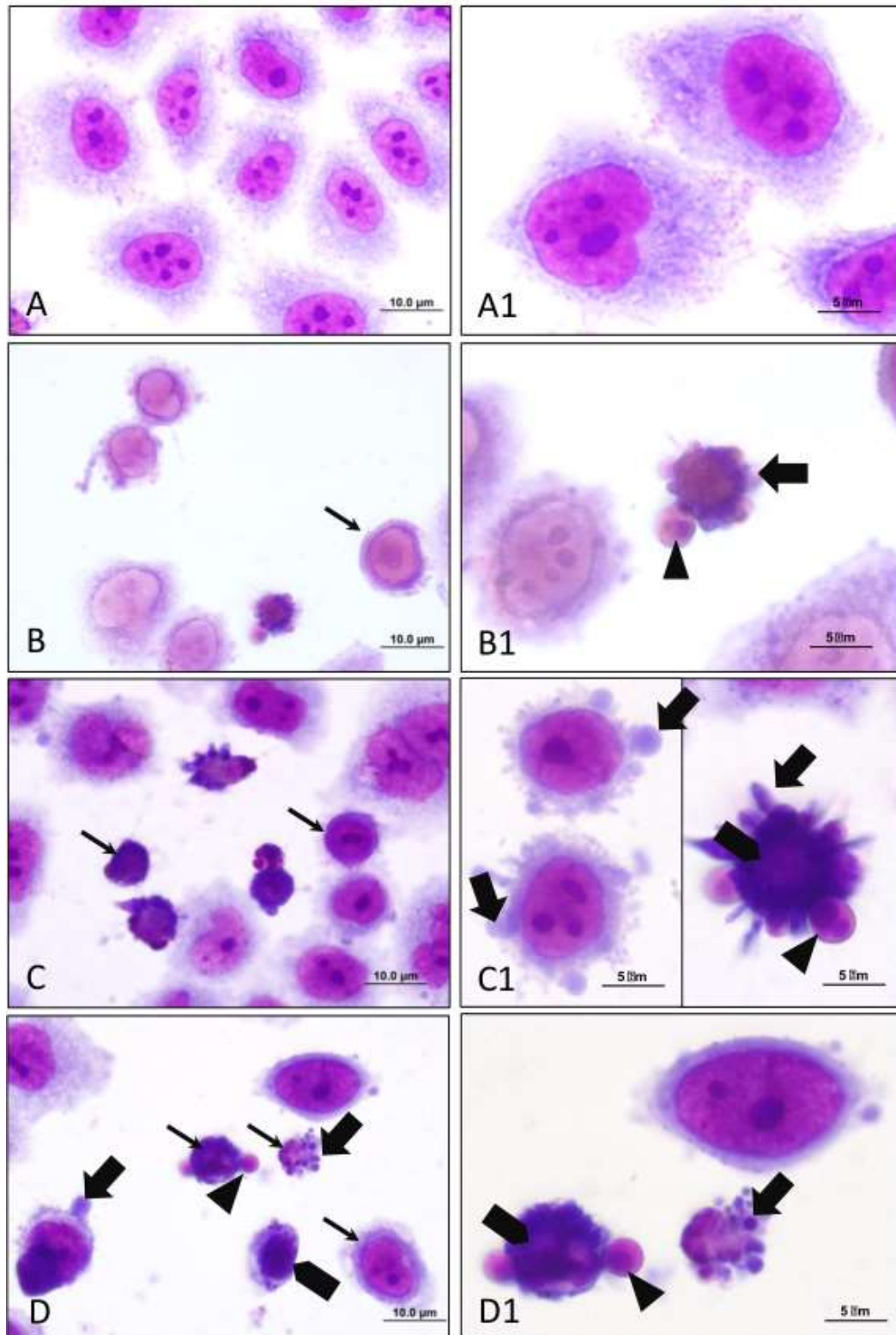
Considerando os resultados anteriores foi possível observar que o Sb_2O_3 foi citotóxico para todas as linhagens testadas. Com o objetivo de evidenciar qual o processo de morte celular poderia estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo Sb_2O_3 foi realizado um ensaio de análise morfológica. Para tanto, foi selecionado dois tipos celulares: O de maior resistência ao tratamento (SH-SY5Y) e outro com citotoxicidade intermediária como parâmetro comparativo (HeLa).

Foi possível observar nos controles, a integridade citoplasmática e nuclear das células HeLa (Figura 9A) e SH-SY5Y (Figura 11A). No entanto, nos tratamentos houve alterações morfológicas compatíveis com processo de morte celular por apoptose na linhagem HeLa e SH-SY5Y quando expostas ao Sb_2O_3 .

Células HeLa expostas a concentrações de 8 μM , apresentaram arredondamento celular, formação de blebs e possível corpo apoptótico (Figura 9B/B1). Com 16 μM (Figura 9C/C1) e 32 μM (Figura 9D/D1) foi possível observar, adicionalmente às estruturas mencionadas, a condensação de cromatina. No ensaio morfológico com as células SH-SY5Y nas concentrações de 64 μM (Figura 11B/B1) e 128 μM (Figura 11C/C1) foi possível observar as mesmas estruturas típicas de morte celular por apoptose encontradas em células HeLa expostas ao Sb_2O_3 . Além destas, a fragmentação de DNA também foi evidenciada no tratamento com 150 μM (Figura 11D/D1) em células SH-SY5Y.

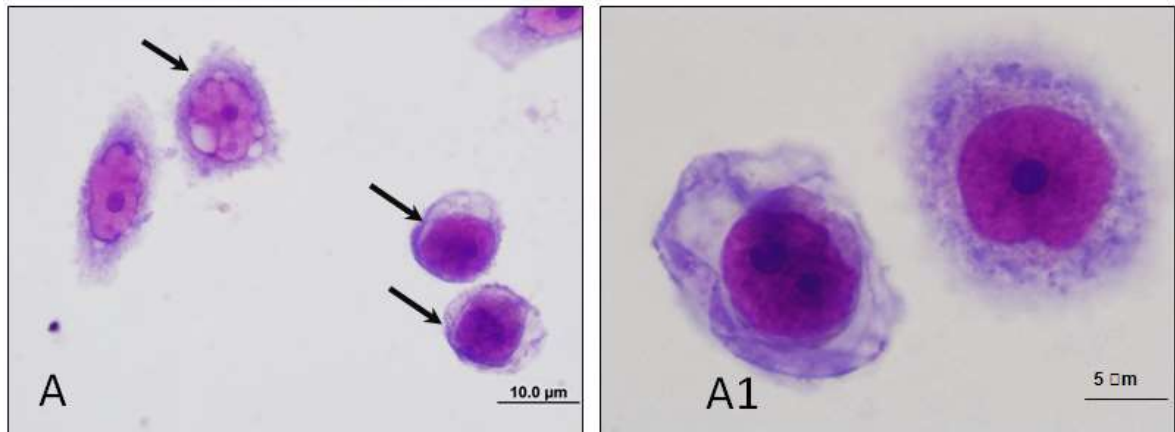
Possíveis eventos distintos à apoptose parecem ocorrer também nas células HeLa em exposição ao Sb_2O_3 na concentração de 32 μM (Figura 10), foi possível observar o arredondamento celular com pouca ou nenhuma condensação de cromatina. A existência de formas intermediárias de morte celular, além de apoptose e necrose "clássicas" como, paraptose, anoikis, onkosis, autofagia e muitos outros exemplos de morte celular, dificultam a determinação exata do processo de morte neste caso, pois podem resultar no aparecimento de características morfológicas distintas (Zhivotovsky, 2004). Trabalhos futuros são necessários para investigar os possíveis mecanismos de morte em doses mais elevadas de Sb_2O_3 para que a compreensão de sua toxicidade seja aprimorada.

Figura 11 – Alterações morfológicas encontradas nas células HeLa tratadas com diferentes concentrações de trióxido de antimônio por 24 horas. A - controle (células incubadas apenas com meio de cultura e o veículo); B - células tratadas com 8 μM de Sb_2O_3 ; C - células tratadas com 16 μM de Sb_2O_3 ; D - células tratadas com 32 μM de Sb_2O_3 . É possível perceber alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina (■), arredondamento celular (→), blebs (▲) e possível corpo apoptótico (►). Aumento de 1000x (letras) e 2000x (letras + 1), coloração de May Grunwald-Giemsa.



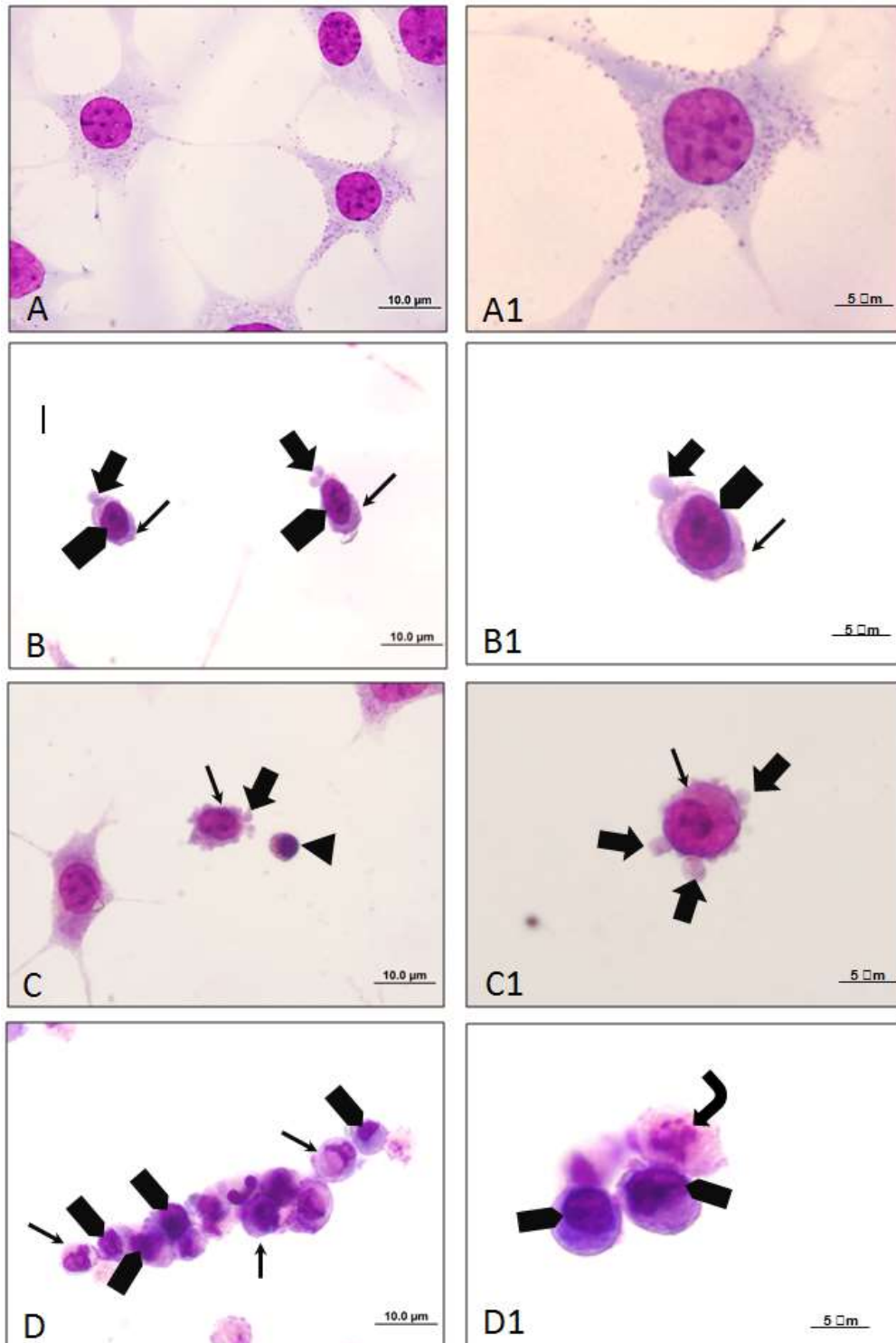
Fonte: A autora

Figura 12 – Alterações morfológicas encontradas nas células HeLa tratadas com 32 μM de trióxido de antimônio por 24 horas. A - células tratadas com 32 μM de Sb_2O_3 . É possível perceber alterações morfológicas importantes como arredondamento celular ($\rightarrow$) com pouca ou nenhuma condensação de cromatina. Aumento de 1000x (letras) e 2000x (letras + 1), coloração de May Grunwald-Giemsa.



Fonte: A autora

Figura 13 – Alterações morfológicas encontradas nas células SH-SY5Y com diferentes concentrações de trióxido de antimônio por 24 horas. A - controle (células incubadas apenas com meio de cultura e o veículo); B - células tratadas com 64 μM de Sb_2O_3 ; C - células tratadas com 128 μM de Sb_2O_3 ; D - células tratadas com 150 μM de Sb_2O_3 . É possível perceber alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina (■), arredondamento celular (→), blebs (▲), possível corpo apoptótico (▶) e fragmentação de DNA (). Aumento (1000x (letras) e 2000x (letras + 1), coloração de May Grunwald-Giemsa.



Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

O Sb_2O_3 é considerado um poluente de alto interesse, pois as concentrações elevadas de antimônio em sistemas ambientais, biológicos e geoquímicos, originários de fontes naturais, geológicas e principalmente antrópicas causam consequências adversas na água potável, na produtividade das culturas agrícolas e consequentemente na cadeia alimentar e saúde humana. As atividades antrópicas de mineração e utilização industrial de Sb_2O_3 em larga escala, têm levado à existência de altos níveis de antimônio no ambiente e à maior exposição e toxicidade humana. Devido as suas consequências na saúde, o Sb_2O_3 tem recebido atenção considerável em todo o mundo na presente década (Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017). Devido a isto, o presente estudo descreveu o efeito do antimônio, em diferentes concentrações, sob a forma de Sb_2O_3 em linhagens celulares.

Os resultados sugerem que o Sb_2O_3 induziu citotoxicidade em todas as linhagens celulares testadas e promoveu redução de viabilidade celular, porém, as linhagens celulares utilizadas apresentaram níveis de suscetibilidade distintos ao tratamento, portanto, algumas células foram mais resistentes que outras. Dessa forma, algumas considerações são relevantes para melhor compreensão dos resultados obtidos. Primeiramente, para testar a capacidade citotóxica do antimônio sob a forma de Sb_2O_3 neste estudo, foi realizado testes *in vitro* com diferentes tipos celulares, incluindo as células de fibroblastos (3T3), escolhidas como padrão de célula não tumoral. Existem estudos toxicológicos de compostos químicos em aplicações industriais com impacto na saúde humana, os quais utilizam células 3T3 (Abreu, 2008; Martini; Gabrielli; Vila, 2012; Uboldi *et al.*, 2016) e este é o caso das investigações relacionadas ao Sb_2O_3 .

Células 3T3 apresentaram diminuição na viabilidade celular nas menores concentrações utilizadas - a partir de 4 μM (Figura 2), apresentando o menor Cl_{50} dentre todas as linhagens (tabela 1). Isso sugere que essas células são altamente suscetíveis ao tratamento com Sb_2O_3 . A citotoxicidade induzida por Sb_2O_3 na linhagem celular de 3T3 também foi investigada por Chen e colaboradores (2010). Segundo os autores o Sb_2O_3 apresentou alta embriotoxicidade, pois as células 3T3 foram altamente suscetíveis ao Sb_2O_3 , apresentando redução de viabilidade com 3,56 $\mu\text{g/ml}$ o equivalente a 12 μM . Portanto, células não tumorais são vulneráveis ao Sb_2O_3 assim como Jiang e colaboradores (2016) relataram com células HEK293.

Células HEK293 apresentaram redução de viabilidade a partir de 8 μM quando expostas ao Sb_2O_3 (Jiang *et al.*, 2016).

A segunda linhagem celular mais vulnerável ao tratamento no presente estudo, foram as células HeLa. Essa linhagem celular foi escolhida como parâmetro comparativo, pois foram expostas ao Sb_2O_3 no estudo de Mann e colaboradores em 2006. No presente estudo, células HeLa quando expostas a concentrações menores que 10 μM de Sb_2O_3 não sofreram redução de viabilidade em 24 horas. A redução da viabilidade em aproximadamente 35% ocorreu com 16 μM . Na concentração de 32 μM de Sb_2O_3 houve redução de mais de 70% em 24 horas (Figura 3A). Em 48 horas a redução de viabilidade nas células HeLa foi de 29%, 65% e 85% com 8 μM , 16 μM e 32 μM , respectivamente. Nas concentrações de 1 μM , 2 μM e 4 μM não houve diferenças estatísticas em relação ao grupo controle em 48 horas (Figura 3B).

Dados semelhantes foram obtidos por Mann e colaboradores (2006) nas primeiras 48 horas de tratamento. Os autores relataram que não foi possível observar morte celular de HeLa induzida por Sb_2O_3 em baixas concentrações (de até 10 μM) nas primeiras 48 horas. Entretanto, no terceiro dia de tratamento, a exposição celular ao Sb_2O_3 leva a morte celular nas concentrações entre 5 e 10 μM . No quarto dia o mesmo fenômeno ocorreu nas concentrações a partir de 1 μM , acentuado pelo co-tratamento com BSO, um inibidor do sistema glutathiona. A glutathiona é um importante antioxidante não proteico nas células e a proporção de sua forma reduzida e oxidada (GSH / GSSG) é um indicador do status redox celular (Schafer; Buettner, 2001; Jones, 2002). Essa característica indica que a morte celular induzida por Sb_2O_3 é relacionada a processos redox e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que o sistema da glutathiona celular é fundamental para a defesa das células contra o estresse oxidativo gerado pela exposição ao Sb_2O_3 (Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009).

Grande parte dos fenômenos que foram relatados envolvendo experimentos *in vitro* com antimônio é devido a semelhanças físico-químicas com o As (arsênio) (Boeck; Kirsch-Volders; Lison, 2003; Beyersmann; Hartwing, 2008; Tamás *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos indicam que o arsênico (As_2O_3), composto que exhibe comportamentos geoquímicos e toxicológicos semelhantes aos do Sb_2O_3 (Gebel, 1997; Tyler; Allan, 2014), é capaz de provocar disfunção cognitiva e neurológica, causando deterioração da memória e instabilidade emocional em

adultos e crianças, sugerindo que o tecido nervoso é um de seus alvos (Tyler; Allan, 2014).

Para verificar se o antimônio também poderia ter efeitos tóxicos em células de origem nervosa, foram utilizadas linhagens já testadas em ensaios *in vitro* com o arsênio e que são amplamente estudadas em ensaios neurotoxicológicos - SH-SY5Y, Neuro-2a e PC12 (Karlsson; Ora; Pörn-Ares; Pahman, 2004; Zhang *et al.*, 2015; Perreaut *et al.*, 2012).

SH-SY5Y é uma sub-linhagem clonada da linhagem celular de neuroblastoma SK-N-SH, proveniente da medula óssea (ATCC), amplamente utilizada como modelo para o estudo da morte celular neuronal induzida por estresse oxidativo (Fordel *et al.*, 2006).

Ao comparar os CI_{50} obtidos, os resultados apresentados aqui, indicam SH-SY5Y como a mais resistente ao tratamento com Sb_2O_3 comparado as linhagens de 3T3, HeLa, Neuro-2a e PC12 utilizadas nos experimentos. O Sb_2O_3 apresentou citotoxicidade em 24 e 48 horas em células SH-SY5Y apenas nas concentrações de 64 μM e 128 μM (Figura 6).

Karlsson e colaboradores (2004) descrevem a morte de linhagens de neuroblastomas humanos induzida por As_2O_3 como um evento tardio. O mesmo fenômeno pode estar relacionado com a exposição ao Sb_2O_3 , tendo em vista que alguns estudos sugerem mecanismos e vias de ação semelhantes aos dois compostos (Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009). A possibilidade do Sb_2O_3 causar morte celular após períodos prolongados de exposição, pode estar relacionada a ausência de morte celular em concentrações de até 32 μM em células SH-SY5Y em 24 e 48 horas relatadas neste estudo.

Sendo assim, células SH-SY5Y foram tratadas por tempos maiores que 48 horas. Para uma análise comparativa, células HeLa também foram tratadas por tempos superiores a 48 horas. Dessa forma, células HeLa e SH-SY5Y foram submetidas ao tratamento pelo período de 5 dias (120 horas) em concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 25 e 32 μM , para que fosse possível obter a comparação de resposta destas células.

Células HeLa após exposição prolongada e concentrações mais elevadas tiveram sua viabilidade celular reduzida em mais de 95% no quinto dia de tratamento (Figura 7E). Já, células SH-SY5Y mostram que o efeito citotóxico só ocorreu em concentração de 32 μM de Sb_2O_3 no quinto dia de tratamento (Figura 8E) e sua

viabilidade celular foi reduzida em pouco menos de 40%, indicando a alta resistência dessas células ao Sb_2O_3 . Células SH-SY5Y foram mais resistentes ao Sb_2O_3 do que as demais linhagens utilizadas neste trabalho e no trabalho de outros autores (Mann *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2016; Lösler *et al.*, 2009).

Em 2019, foi demonstrado por Tauffernberger e colaboradores, que o aumento moderado na produção de EROs (como aquela gerada pela exposição ao Sb_2O_3) promove resistência ao estresse oxidativo e longevidade por meio da ativação das vias PI3K / AKT e mTOR em células SH-SY5Y. Os autores também descreveram a ativação de HIF1 α *in vitro*. Isto sugere que o ambiente pró-oxidativo leve, ativa essas vias para promover a sobrevivência celular de SH-SY5Y (Tauffenberger; Fiumelli; Almustafa; Magistretti, 2019). Enquanto mTOR é um membro da família de quinase relacionada a PI3K que regulam diferentes processos celulares (Lipton; Sahin, 2014), a HIF1 α *in vitro* é considerada como o principal regulador da transcrição de resposta celular e desenvolvimento de hipoxia (Iyer *et al.*, 1998).

Também foi relatado que a superexpressão da glutathione-S-transferase nas células do neuroblastoma humano SH-SY5Y aumenta a resistência ao estresse oxidativo (Xie *et al.*, 2001). Além disso, Fordel e colaboradores (2006) indicaram que a neuroglobina (NGB) e citoglobina (CYGB), ambas proteínas de ligação ao O_2 protegem células SH-SY5Y da morte celular e que essas proteínas desempenharam um papel fundamental na defesa celular contra agentes oxidativos nestas células. As funções fisiológicas de ambas as proteínas não são totalmente compreendidas, mas discutidas com relação à desintoxicação de EROs (Avivi *et al.*, 2010). Em 2015, Ye e colaboradores relataram o papel protetor de Nrf2 contra apoptose e estresse oxidativo induzido em células SH-SY5Y. Os autores descobriram que o Nrf2 é responsável pela resistência das células SH-SY5Y no tratamento com metal pesado (Pb) (Ye *et al.*, 2015). Além disso, no estudo de Jiang e colaboradores 2016, foi identificado a expressão de Nrf2 de maneira dependente de EROs sobre o estresse oxidativo na exposição ao Sb_2O_3 em outro tipo celular. Isso revela um desempenho importante na mediação da citoproteção em células SH-SY5Y, pois confere resistência apoptótica ao estresse oxidativo. Essas características podem representar um mecanismo de defesa eficaz quando comparado as células HeLa e 3T3, expostas ao Sb_2O_3 .

Células Neuro-2a por sua vez, se apresentaram resistentes ao tratamento, mesmo que em menor proporção comparado às células SH-SY5Y neste estudo. Foi possível observar o efeito citotóxico do Sb_2O_3 a partir de 32 μM em 24 horas e de 16 μM em 48 horas nas células Neuro-2a (Figura 5).

Como já mencionado, a produção de EROs pode ser o principal mecanismo subjacente à citotoxicidade por Sb_2O_3 nas células (Al-Gubory, 2014; Phaniendra; Jestadi; Periyasamy, 2015). Efeitos citotóxicos por estresse oxidativo em células Neuro-2a, foram investigados por Lu e colaboradores em 2013. Os autores indicam que o tratamento com até 10 μM de As_2O_3 , diminuiu o número de células viáveis por meio da redução da expressão da proteína Nrf2 - a mesma relacionada à resistência de células SH-SY5Y. Este fenômeno levou as células Neuro-2a a apoptose, por intermédio da via intrínseca apoptótica dependente das mitocôndrias. Os dados apresentados pelos autores mostram o aumento efetivo da liberação de citocromo C na fração citosólica, diminuição acentuada dos níveis de expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e aumento nos níveis das proteínas Bax pró-apoptóticas (Lu *et al.*, 2013). Células Neuro-2a em situações de estresse oxidativo induzem a expressão de mRNA dos principais genes de resposta antioxidante na via Nrf-2, incluindo dentre outros, a heme oxigenase 1 (HO-1), todos envolvidos na proteção dessas células. Porém, em situações de extrema superprodução de EROs, células Neuro-2a ampliam os sinais apoptóticos intracelulares (Wu; Chen, 2017), o que talvez, possa ter favorecido a redução de viabilidade destas células em concentrações elevadas de Sb_2O_3 utilizadas no presente estudo.

Embora as células SH-SY5Y e Neuro-2a sejam neuroblastomas, o organismo e o tecido do qual tiveram origem são distintos, portanto, as características celulares são específicas de cada linhagem. Estes fatores podem ter determinado diferentes respostas ao tratamento, pois diferentes tipos celulares apresentam diferentes respostas quando expostas ao Sb_2O_3 (Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009).

Os dados da linhagem PC12 apresentados neste trabalho apontam que a diminuição da viabilidade foi significativa apenas na maior concentração de 128 μM de Sb_2O_3 independente do tempo de tratamento realizado (24 e 48 horas), porém a concentração necessária para matar 50% das células diminuiu no segundo dia (Figura 4B). Isso demonstra que o tempo de tratamento também possui influência na viabilidade celular. Houve, também, maior redução do MTT em 16 μM em 24 horas

(Figura 4A). É possível que esse resultado seja decorrente do aumento do metabolismo em células viáveis, promovido pela situação de estresse gerada pelo Sb_2O_3 , com uma discreta citotoxicidade. Este metabolismo caracterizado por maior atividade mitocondrial é refletido em maior redução de MTT e já foi descrito anteriormente em outras situações (Wang; Henning; Heber, 2010; Karakas; Ari; Ulukaya, 2017; Rai *et al.*, 2018). A realização de um ensaio de citotoxicidade com fundamento diverso do MTT, como o vermelho neutro, poderia ajudar a esclarecer essa situação. Este resultado também pode ser justificado pela proliferação celular, uma vez que os efeitos moleculares nocivos do antimônio podem induzir a proliferação celular durante processo de carcinogênese, pois o antimônio é considerado um possível promotor de tumor *in vitro* e *in vivo* (Zhang *et al.*, 2017). Em 2019, Wang e colaboradores forneceram a primeira evidência celular do envolvimento de neurotoxicidade após a exposição ao antimônio. Células PC12 apresentaram redução de viabilidade a partir de concentrações elevadas de antimônio (75 μM). Além disso, os autores relataram que a exposição ao antimônio resultou na ativação da autofagia pró-apoptótica acompanhada pela inibição da via Akt / mTOR, e que um ativador do Akt reduziu a autofagia induzida pelo antimônio, mesmas vias de sinalização envolvidas na proteção de células SH-SY5Y submetidas a estresse oxidativo. Isso, talvez, possa explicar a maior resistência destas linhagens comparada as células HeLa e 3T3 utilizadas neste estudo. Além disso o estudo de Wang e colaboradores (2019) forneceu evidências de que a produção de EROs está envolvida na morte celular de células PC12 submetidas ao tratamento com Sb_2O_3 .

Células PC12 já foram descritas como mais tolerantes ao estresse oxidativo comparada às células Neuro-2a (Asadpour *et al.*, 2016). Hirata e colaboradores (1998) relataram alterações em células PC12 quando submetidas ao estresse oxidativo por metal pesado (Mn) e os autores evidenciaram fragmentação de DNA, morte por apoptose por meio de EROs, ativação da via JNK e seus mecanismos a jusante, bem como já relatado em outras células expostas ao Sb_2O_3 por Mann e colaboradores (2006).

Os dados de Hirata e colaboradores (1998), Wang *et al* (2019) e os deste trabalho convergem suportando a hipótese de que esta linhagem apresenta uma resistência maior a ação de metais pesados e semi-metais. Isso pode sinalizar a capacidade destas células de se adaptarem a agentes estressores desta natureza.

Os dados apresentados aqui indicam que a citotoxicidade das células é acentuada quando expostas ao Sb_2O_3 por um período de tempo maior e maiores concentrações e que diferentes linhagens celulares respondem de maneiras diferentes. Pode-se inferir que a divergência de resposta entre tipos celulares distintos a um determinado estímulo ocorre por consequência de milhões de anos de evolução, onde as células desenvolveram uma infinidade de mecanismos para lidar com os potenciais efeitos prejudiciais, incluindo aqueles causados por EROs. Neste caso, esses mecanismos incluem enzimas antioxidantes, como: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e tioredoxinas, além de antioxidantes não protéicos, como glutathione (GSH), α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), bilirrubina e coenzima Q10 (revisado por Wang e Michaelis, 2010). A combinação de proteínas antioxidantes e moléculas menores oferece um sistema versátil e flexível para controlar os níveis intracelulares de EROs. A alta eficiência desse sistema nas células, é mantida através da localização subcelular diversa dos antioxidantes, de suas propriedades bioquímicas e da indutibilidade diferencial das enzimas antioxidantes nos níveis transcricional e traducional (Valko *et al.*, 2007) e isso pode ser determinante na vulnerabilidade das células.

No presente estudo, cada célula apresentou diferente suscetibilidade, então, essas diferenças de resposta ao tratamento com antimônio provavelmente ocorreram por inúmeros fatores envolvendo a diversidade metabólica apresentada pelas diferentes linhagens, influenciados também pela capacidade de proteção das células contra agentes nocivos como o Sb_2O_3 . Os alvos do antimônio incluem tecidos altamente vascularizados e ricos em células epiteliais (Edel; Marafante; Sabbioni; Manzo, 1983; Poon *et al.*, 1998; 2001; Costa, 2016). Entretanto, o antimônio pode sofrer alterações que envolvem processos biológicos, físicos e químicos (Krachler; Emons; Zheng, 2001; Herath; Vithanage; Bundschuh, 2017), os quais dificultam a determinação do grau de toxicidade em linhagens celulares diferentes. Essa hipótese é reforçada por estudos que demonstram que diferentes tipos celulares expostos ao antimônio ou arsênio respondem de forma diferente (Karlsson; Ora; Pörn-Ares; Pahman, 2004; Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2016; Banerjee *et al.*, 2018). Os resultados obtidos no presente estudo com a linhagem celular SH-SY5Y indicam que a resistência ao antimônio não está relacionada a linhagens celulares com resistência a múltiplas

drogas, já que esta linhagem não apresenta essa característica (Karlsson; Ora; Pörn-Ares; Pahman, 2004).

É válido ressaltar que citotoxicidade é caracterizada pelos efeitos adversos resultantes da interferência nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular. Os efeitos resultantes da citotoxicidade podem incluir alterações na permeabilidade da membrana e do citoesqueleto, alterações no metabolismo celular, síntese, degradação ou liberação de constituintes ou produtos celulares, regulação de íons e divisão celular. (Kroemer *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2018).

Como discutido anteriormente, esses fatores podem desencadear um processo de morte celular. Estão dentre os processos de morte celular: necrose, apoptose, autofagia, citostase, cornificação e muitos outros (Kroemer *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2018). No que se refere aos ensaios realizados com May Grunwald-Giemsa para determinação de possíveis alterações morfológicas e direcionamento para algum processo de morte celular foram escolhidas as células HeLa e SH-SY5Y.

Foi possível observar nos controles, a integridade citoplasmática e nuclear das células HeLa (Figura 9A) e SH-SY5Y (Figura 11A), entretanto, quando tratadas com Sb_2O_3 , ambas linhagens celulares apresentaram alterações morfológicas características de morte celular por apoptose, como formação de “*blebs*” ou “*budding*”, condensação de cromatina, arredondamento celular e formação de corpos apoptóticos (Cruchten; Broeck, 2002; Meer *et al.*, 2010). Esses eventos puderam ser observados nas células SH-SY5Y (Figura 11B, C e D) em concentrações mais elevadas de Sb_2O_3 , comparada as células HeLa (Figura 9B, C e D). As concentrações utilizadas nos ensaios foram específicas para cada tipo celular, considerando a concentração de citotoxicidade intermediária para cada uma das células, determinada previamente por MTT.

O evento da apoptose celular já é conhecido como decorrente da citotoxicidade induzida por Sb_2O_3 (Karlsson; Ora; Pörn-Ares; Pahman, 2004; Mann *et al.*, 2006; Lösler *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2016). Em células HeLa, algumas vias de sinalização conhecidas já foram relatadas em modelos de estudo com Sb_2O_3 , envolvendo a AP-1, alvo a jusante JNK, como já discutido anteriormente (Mann *et al.*, 2006). Entretanto, foi possível observar também arredondamento celular com pouca ou nenhuma condensação de cromatina (Figura 10) em células HeLa na maior concentração (32 μM) de Sb_2O_3 utilizada neste experimento. O presente

estudo indica que a exposição ao Sb_2O_3 em concentrações mais elevadas, a partir de 32 μM , pode ter desencadeado, também, outro tipo de morte em células HeLa, pois essas alterações morfológicas não são características da morte celular por apoptose. Esse resultado justifica-se pelo fato de que se a concentração de um composto for letal em um período muito curto, as células podem escapar à destruição proteolítica desencadeada por apoptose e podem morrer por necrose ou esses processos podem ocorrer simultaneamente (Zhivotovsky, 2004).

Em neuroblastomas, Karlsson e colaboradores (2004) discutiram que o processo de apoptose celular por As_2O_3 , análogo químico do Sb_2O_3 , é um evento tardio, ocorrendo apenas em períodos prolongados de exposição. Entretanto, não há relatos de estudos com SH-SY5Y envolvendo o Sb_2O_3 nas mesmas condições. Os resultados apresentados neste trabalho apontam que o mesmo fenômeno parece ocorrer no tratamento com Sb_2O_3 nestas células, pois, o efeito citotóxico em células SH-SY5Y em curtos períodos, ocorreu apenas em concentrações superiores quando comparadas as linhagens que não possuíam origem nervosa, como a 3T3 e HeLa.

É importante considerar que a análise morfológica por microscopia ótica, por si só, não é suficiente para determinar um processo de morte celular específico. É necessário complementar essa análise com ensaios bioquímicos ou com microscopia eletrônica, por exemplo. A combinação de eventos bioquímicos e morfológicos é necessária para a confirmação de um determinado processo de morte celular (Zhivotovsky, 2004). Entretanto, a análise morfológica, por microscopia ótica, é um método barato, simples e eficiente para a triagem e direcionamento da execução de outras técnicas mais sofisticadas.

7 CONCLUSÕES

O Sb_2O_3 foi capaz de induzir citotoxicidade em todas as linhagens celulares testadas.

A linhagem celular 3T3 foi a mais suscetível ao efeito citotóxico de Sb_2O_3 , com o menor valor de Cl_{50} , quando comparada as demais linhagens.

Células HeLa apresentaram maior resistência ao tratamento somente nas menores concentrações de Sb_2O_3 (1, 2 e 4 μM).

As linhagens de origem nervosa (PC12, Neuro 2-a e SH-SY5Y) foram mais resistentes ao Sb_2O_3 do que as células 3T3 e HeLa.

Células SH-SY5Y foram as mais resistentes ao efeito citotóxico do Sb_2O_3 , com o maior valor de Cl_{50} , quando comparada com as demais linhagens celulares testadas.

O ensaio de coloração May Grunwald-Giemsa mostrou indícios de morte celular por apoptose em células HeLa e SH-SY5Y após tratamento com o Sb_2O_3 .

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) — Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for antimony and compounds**. ATSDR, 1992.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Antimony**. ATSDR, 2011. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=58>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- AL-GUBORY, K. H. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. **Reprod Biomed Online**, Cambridge, v. 29, n. 1, p. 17-31, Jul. 2014.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **ATCC guide to packaging and shipping of biological materials. american type collection culture**. EUA, set. 1994. Disponível em: <https://www.atcc.org/>. Acesso em: 20 abr. 2018.
- ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Geochemistry**, Alemanha, v. 72, n. 4, p.3-8, Jul. 2012.
- ANDRADE, J. K. **Especiação do antimônio em amostras de água mineral e especiação de cromo em águas naturais empregando métodos de microextração e espectrometria de absorção atômica**. 2018. Tese (Doutorado em Química) — Programa de Pós-Graduação em química, Universidade Estadual de Ponta Grossa. Associação ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, Ponta Grossa, 2018.
- APESTEGUIA, J. A. Determinación de antimonio en agua embotellada en envases de Polietileno Tereftalato (PET) de venta ambulatoria. **Ciencia e Investigación**, Argentina, v. 20, n. 1, p. 21-24, 2017.
- ARAI, Y. Arsenic and antimony. **Trace Elem. Soil J.**, Kingston University London, p. 381-407, 15 Apr. 2010.
- ASADPOUR, E. *et al.* Oxidative stress-mediated cytotoxicity of zirconia nanoparticles on PC12 and N2a cells. **Journal of Nanoparticle Research.**, Springer Netherlands, v. 18, n. 1, article id. 14, Jan. 2016.
- ASEERVATHAM, G. S.; SIVASUDHA, T.; JEYADEVI, R.; ARUL, A. D. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans--an overview. **Environ Sci Pollut Res Int.**, Berlin, v. 20, n. 7, p. 4356-4369, Jul. 2013.

AVIVI, A. A. *et al.* Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. **PNAS**, Washington, v. 107, n. 50, p. 21570-21575, 19 Nov. 2010.

BALTAZAR, M. T. *et al.* Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - a mechanistic approach. **Toxicol Lett.**, Ireland, v. 230, n. 2, p. 85-103, 15 Oct. 2014.

BANERJEE, M. *et al.* Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) Mediated Cellular Protection and Transport of Methylated Arsenic Metabolites Differs between Human Cell Lines. **Drug Metab Dispos**, Bethesda, MD, USA, v. 46, n. 8, p. 1096-1105, Aug. 2018.

BELZILE, N.; CHEN, Y.-W; FILELLA, M. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews, Amsterdam**, v. 57, n. 1, p.125–176, May 2002.

BELZILE, N.; CHEN, Y.-W; FILELLA, M. Human exposure to antimony: I. Sources and Intake. **Critical reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 41, p. 1309-1373, 2011.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493-512, 2008.

BOECK, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research.**, Amsterdam, v. 533, n. 1-2, p. 135-152, 10 Dec. 2003.

BREBU, M.; JAKAB, E.; SAKATA, Y. Effect of flame retardants and Sb₂O₃ synergist on the thermal decomposition of high-impact polystyrene and on its debromination by ammonia treatment. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Netherlands, v. 79, n. 1–2, p. 346-352, May 2007.

BUTTERMAN, W. C.; CARLIN JUNIOR, J. F. Mineral commodity profiles antimony. Department of the Interior U.S. **Geological Survey**, 2004.

CARNEADO, S.; HERNÁNDEZ-NATAREN, E.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F.; SAHUQIOLLO, A. Migration of antimony from polyethylene terephthalate used in mineral water bottles. **Food Chem**, United Kingdom, v. 166, p. 544-550, 1 Jan. 2015.

CHEN, R. *et al.* Assessment of embryotoxicity of compounds in cosmetics by the embryonic stem cell test. **Toxicology Mechanisms And Methods**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 112–118, 2010.

COSTA, D. D. M. **Avaliação dos efeitos do trióxido de antimônio sobre o sistema endócrino e reprodutivo e sobre as condições oxi-redutoras em ratos Wistar**. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) — Departamento de Biologia Celular, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

CRUCHTEN, S. V.; BROECK, W. V. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol**, Alemanha, v. 31, n. 4, p. 214-223, Aug. 2002.

EDEL, J.; MARAFANTE, E.; SABBIONI, E.; MANZO, L. Metabolic behaviour of inorganic forms antimony in the rat. *In*: **In International Conference - Heavy Metals in the Environment**, Heidelberg, W Germany, 1983. p. 574-577.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y.-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews**, Netherlands, v. 57, p. 105 125–176, 2002.

FLAKOVA, R. *et al.* The behavior of arsenic and antimony at Pezinok mining site, southwestern part of the Slovak Republic. Environ. **Earth Sci**, Toronto, v. 66, n. 4, p. 1043-1057, jun. 2012.

FORDEL, E. *et al.* Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death. **Neuroscience Letters**, Ireland, v. 410, n. 2, p. 146-151, 20 Dec. 2006.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, Jersey City, v. 25, n. 3, p. 486-541, Mar. 2018.

GEBEL, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. **Chem. Biol. Interact.**, New York, v. 107, n. 3, p. 131-144, 28 Nov. 1997.

GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT. BFR recommendation of the Federal Institute of Risk Assessment. **BFR**, 2011.

GURNANI, N.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of the clastogenic effects of antimony trioxide on mice in vivo following acute and chronic exposure. **BioMetals**, Houston St., v. 5, n. 1, p.47-50, May 1992.

HASHIMOTO, H.; NISHIMURA, T.; UMETSU, Y. Hydrolysis of antimony(III)-hydrochloric acid solution at 25 °C. **Materials Transactions**, v. 44, n. 8, p. 1624–1629, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.2320/matertrans.44.1624>. Acesso em: 26 mar. 2018.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int**, New York, v. 2011, p. 571242, 8 Jun. 2011.

HE, M. *et al.* Antimony speciation in the environment: recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. **Journal of Environment Sciences**, China, v. 75, p. 14-39, Jan. 2019.

HE, M.; WANG, X.; WU, F.; FU, Z. Antimony pollution in China. **Sci Total Environ.**, Amsterdam, Netherlands, v. 421-422, p. 41-50, 1 Apr. 2012.

HERATH, I.; VITHANAGE, M.; BUNDSCHUH, J. Antimony as a global dilemma: Geochemistry, mobility, fate and transport. **Environmental Pollution**, Pennsylvania, v. 223, n.1, p. 545-559, Feb. 2017.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic feeding study of antimony trioxide in rats. **Journal of applied toxicology**, United Kingdom, v. 19, n. 3, p. 205-209, 1999.

HIRATA, Y.; ADACHI, K.; KIUCHI, K. Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 Cells. **Journal of Neurochemistry Lippincott**, Philadelphia, v. 71, n. 4, p. 1607-1615, Oct. 1998.

HU, X.; HE, M.; LI, S. Antimony leaching release from brake pads: effect of pH, temperature and organic acids. **J. Environ. Sci**, California, v. 29, p. 11-17, 1 Mar. 2015.

ISLAM, A. *et al.* Cytotoxicity and apoptotic activity organobismuth (V) and organoantimony (V) complexes in diferente câncer cell lines. **European Journal of Medicinal chemistry**, Paris, v. 109, p. 254-267, 7 Jan. 2016.

JIANG, X. *et al.* The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicology Letters**, Ireland, v. 256, p.11–18, 18 May. 2016.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, Virginia, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 10 May 2011.

JONES, D. P. Potencial redox do casal GSH/ SSG: ensaio e significado biológico. **Meth. Enzymol.**, San Diego, v. 348, p. 93-112, 2002.

KARAKAS, D.; ARI, F.; ULUKAYA, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, Turkiye, v. 41, n. 6, p. 919-925, 18 Dec. 2017.

KARLSSON, J.; ORA, I.; PÖRN-ARES, I.; PAHMAN, S. Arsenic Trioxide-Induced Death of Neuroblastoma Cells Involves Activation of Bax and Does Not Require p53. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 10, n. 9, p. 179-188, 1 May. 2004.

KOCH, B.; MASER, E.; HARTIWIG, A. Low concentrations of antimony impair DNA damage signaling and the repair of radiation-induced DSB in Hela S3 cells. **Archives of Toxicology**, New York, v. 91, n. 12, p. 3823-3833, Dec. 2017.

KRACHLER, M.; EMONS, H.; ZHENG, J. Speciation of antimony for the 21st century: promises and pitfalls. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Canada, v. 20, n. 2, p. 79-90, Feb. 2001.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, Jersey City, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan. 2009.

LABSYNTH. Ficha com dados de segurança. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Merk Millipore. **Trióxido de antimônio**. Revisado em 2017. Disponível em: downloads.labsynth.com.br. Acesso em: 20 jan. 2020.

LI, W.; KONG, A. N., 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. **Mol. Carcinog.**, Hoboken, v. 48, n. 2, p. 91-104, Feb. 2009.

LIN, A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. **Bioessays**, Hoboken, v. 25, n. 1, p. 17-24, Jan. 2003.

LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The Neurology of mTOR. **Neuron**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 275-291, 22 Oct. 2014.

LÖSLER, S. *et al.* Antimony-trioxide-and arsenic-trioxide-induced apoptosis in myelogenic and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular glutathione redox system. **Annals of Hematology**, New York, v. 88, n.11, p.1047-1058, 21 Mar. 2009.

LU, J. *et al.* Arsenic induces apoptosis in human neuroblastoma cells through mitochondrial pathways involving cytochrome c release and regulation of Bcl-2 and Bax. **Toxicology Letters**, v. 221, n. 1, p. 45–52, 2013.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v. 53, p. 401-426, 2013.

MANN, K. K. *et al.* Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicol Lett.**, Ireland, v.160, n. 2, p.158-170, Jan. 2006.

MARTINI, C. N.; GABRIELLI, M.; VILA, M. C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, Netherlands, v. 26, n. 6, p. 1007-1013, Sep. 2012.

MEER, F. J. V. D. *et al.* Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**, United Kingdom, v. 25, n. 2, p.259–267, Mar. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Antimony trioxide. **NCBI**, 2020. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/436>. Acesso em: 18 Mar. 2020.

NRIAGU, J. O. Antimony in the environment: a review focused on natural waters. **Earth Science Reviews**, Netherlands, n. 57, p. 125-176, 2000.

OMURA, M. T. *et al.* Testicular toxicity evaluation of two antimony compounds, antimony trioxide and antimony potassium tartrate, in rats and mice. **Environ Health Prev Med**, Japão, v. 7, n. 1, p. 15-18, Apr. 2002.

OU, D. L. *et al.* 2010. Induction of DNA damage-inducible gene GADD45beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 70, n. 22, p. 9309–9318, 15 Nov. 2010.

OZÓRIO, R. W.; ROSA, M. D.; PEIXOTO, C. L.; GARCIA, A. Cell/dendrite transition and electrochemical corrosion of Pb–Sb alloys for lead-acid battery applications. **Journal of Power Sources**, Netherlands, v. 196, n. 15, p. 6567-6572, Aug. 2011.

PERREAULT, F. *et al.* Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotoxicity Research**, v. 22, n. 2, p. 138–149, 2012

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem**, New Delhi, v. 30, n. 1, p. 11-26, Jan. 2015.

PIERART, A.; SHAHID, M.; SEJALON-DELMAS, N.; DUMAT, C. Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. **J. Hazard. Mater**, Netherlands, v. 30, n. 289, p. 219-234, May. 2015.

POLJSAK, B.; FINK, R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. **Oxid Med Cell Longev**, England, v. 2014, n. 1, Jul. 2014.

POON, I. R. *et al.* Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. **Food and Chemical Toxicology**, England, v. 36, n. 1, p. 21-35, Jan. 1998.

QIAO, F. *et al.* Effects of storage temperature and time of antimony release from PET bottles into drinking water in China. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, Germany, v. 25, n. 2, p. 1388–1393, Jan. 2018.

RAI, Y. *et al.* MTT assay for assessing cell metabolic activity: pitfalls and interpretation in stress conditions. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 94, p. 35–41, 2018.

RAMA, M.; KUMAR, N. V. A.; BALAJI, S. A comprehensive review of patented antileishmanial agents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, United Kingdom, v. 4, n. 1, p. 37-56, Jan. 2015.

SALERNO, D. M.; TRONT, J. S.; HOFFMANN, B.; LIEBERMANN, D. A. Gadd45a and Gadd45b modulate innate immune functions of granulocytes and macrophages by differential regulation of p38 and JNK signaling. **J. Cell. Physiol.**, New York, v. 227, n. 11, p. 3613-3620, Nov. 2012.

SALVADOR, J. M.; BROWN-CLAY, J. D.; FORNACE JUNIOR, A. J. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 793, p. 1–19, 2013.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, California, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, Jun. 2001.

SHANAWANY, S. E. *et al.* The potential DNA toxic changes among workers exposed to antimony trioxide. **Environ Sci Pollut Res Int.**, Berlin, v. 24, n. 13, p. 12455–12461, May 2017.

SHTANGEEVA, I. *et al.* Antimony accumulation in wheat seedlings grown in soil and water. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, Philadelphia, v. 45, n. 7, p. 968–983. 2014.

SIGMA ALDRICH. Ficha de dados de segurança – Antimony (III) oxide. **SIGMA Aldrich**, 2020. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/20/202649/202649-BULK_____ALDRICH_.pdf. Acesso em: 20 fev. 2020.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, London, v. 2, n. 2, p. 188-194, 1999. SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Switzerland, v. 7, n.12, p.4267-4277, Dec. 2010.

TAMÁS, M. J. *et al.* Arsenic and antimony: toxicity, uptake and metabolism in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 1, p. 1–20, 2014.

TAUFFENBERGER, A.; FIUMELLI, H.; ALMUSTAFA, S.; MAGISTRETTI, P. J. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. **Cell Death and Disease**, London, Article n. 653, 10 Sep. 2019.

TIAN, H. Z. *et al.* Temporal and spatial distribution of atmospheric antimony emission inventories from coal combustion in China. **Environ. Pollut.**, United Kingdom, v. 159, n. 6, p. 1613-1619, Jun. 2011.

TURNER, A.; FILELLA, Antimony in paints and enamels of everyday items. **Science of The Total Environment**, Netherlands, v. 713, p. 136588, 15 Apr. 2020.

TYLEND, C. A.; SULLIVAN, D. W.; FOWLER, B. A. Antimony. *In*: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORBERG, M. **Handbook on the toxicology of metals**. 4th ed. New York: Academic Press, 2015. Volume II – Specific Metals, Chapter 27, p. 565-579.

TYLER, C. R.; ALLAN, A. M. The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. **Curr Environ Health Rep**, New York, v. 1, n. 2, p.132–147, 21 Mar. 2014.

UBOLDI, C. *et al.* Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology in Vitro.**, Belgium, v. 31, p. 137-145, 2016.

UNGUREANU, G.; SANTOS, S.; BOAVENTURA, R.; BOTELHO, C. Arsenic and antimony in water and wastewater: overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. **Journal of Environmental Management.**, United Kingdom, v. 151, p. 326-342, 15 Mar. 2015.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY MINERAL RESOURCES PROGRAM. *Antimony: world mine production, by country*. **Index Mundi**, 2020. Disponível em: https://www.indexmundi.com/en/commodities/minerals/antimony/antimony_t9.html. Acesso em: 18 abr. 2020.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Bio**, England, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERDUGO, M.; OGRA, Y.; QUIROZ, W. Mechanisms underlying the toxic effects of antimony species in human embryonic kidney cells (HEK 293) and their comparison with arsenic species. **J Toxicol Sci.**, Japan, v. 41, n. 6, p. 783-792, 2016.

WANG, X. *et al.* Antimony, a novel nerve poison, triggers neuronal autophagic death via reactive oxygen species-mediated inhibition of the protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 114, p. 105561, 2019.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **Plos One**, California, v. 5, n. 4, p. e10202, 16 Apr. 2010.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci**, Switzerland, v. 2, n. 12, 30 Mar. 2010.

WITTEKIND, D. On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: An overall view. **Histochem J.**, Netherlands, v. 15, n. 10, p. 1029-1047, Oct. 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimony in drinking water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **WHO**, Geneva, 2003.

WU, C. CHEN, Y. Assessment of Industrial Antimony Exposure and Immunologic Function for Workers in Taiwan. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.14, n.7, p.689, jun. 2017.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, Maryland, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, Sep. 2004.

XIE, Y. et al. Overexpression of glutathione S-transferase protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress. **Brain Research**, v. 915, n. 2, p. 181–189, 2001.

XIONG, J. *et al.* heavy metals induce decline of derivatives of 5-methylcytosine in both DNA and RNA of stem cells. **ACS Chem Biol.**, Washington, v. 12, n. 6, p. 1636-1643, 2017.

YANG, Z.; SONG, L.; HUANG, C. Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades. **Curr Cancer Drug Targets**, China, v. 9, n. 8, p. 915–930, Dec. 2009.

YE, F. *et al.* The role of Nrf2 in protection against Pb-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells. **Food Chem. Toxicol.**, United Kingdom, v. 86, p. 191–201, Dec. 2015.

YOO, J. *et al.* Transforming growth factor-beta- induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 44, p. 43001–43007, 31 Oct. 2003.

ZHANG, H. *et al.* A polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* attenuates amyloid- β -induced neurotoxicity in PC12 cells. **Carbohydr Polym**, England, v. 117, p. 879-886, 6 Mar. 2015.

ZHANG, S. *et al.* Co-combustion of bituminous coal and pickling sludge in a drop tube furnace: thermodynamic study and experimental data on the distribution of Cr, Ni, Mn, As, Cu, Sb, Pb, Cd, Zn, and Sn. **Energy Fuel**, California, v. 31, p. 3019-3028, 2017.

ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis, necrosis and between. **Cell Cycle**, United Kingdom, v. 3, n. 1, p. 64-66, Jan. 2004.

ZOTOV, A. V.; SHIKINA, N. D.; AKINFIEV, N. N. Thermodynamic properties of the Sb (III) hydroxide complex $\text{Sb}(\text{OH})_{3(\text{aq})}$ at hydrothermal conditions. **Geochim Cosmochim Acta**, England, v. 67, n. 10, p. 1821-1836, 15 May. 2003.