

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

**GABRIEL ELIAS BUENO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO ( $Sb_2O_3$ ) NA  
LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

**PONTA GROSSA**

**2022**

**GABRIEL ELIAS BUENO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ) NA  
LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Biologia  
Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele Dietrich Moura Costa  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Appel

**PONTA GROSSA**

**2022**

B928 Bueno, Gabriel Elias  
Avaliação do efeito do trióxido de antimônio ( $Sb_2O_3$ ) na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y / Gabriel Elias Bueno. Ponta Grossa, 2022.  
62 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. Márcia Helena Appel.

1. Trióxido de antimônio. 2. Viabilidade celular. 3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidante. 5. Diferenciação celular. I. Costa, Michele Dietrich Moura. II. Appel, Márcia Helena. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV.T.

CDD: 576



Universidade Estadual  
de Ponta Grossa



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR e MOLECULAR 07/2022 DO MESTRANDO GABRIEL ELIAS BUENO REALIZADA NO DIA 19 DE DEZEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

No dia dezanove de dezembro do ano de dois mil e vinte dois, às 18h00min, através do sistema de web conferência da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em seção pública, sob a presidência da Professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Appel (co-orientadora) e presença da orientadora Profa Dra Michele Dietrich Moura Costa reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando Gabriel Elias Bueno na linha de pesquisa "Bioquímica dos Processos Celulares", constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Dra. Sílvia Daniele Rodrigues da Instituição Weill Cornell Medicine e Profa. Carla Cristine Kanunfre (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao 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: "AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO (Sb2O3) NA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SHSY5Y". 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, o aluno deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item II da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno 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.

Profa. Dra. Márcia Helena Appel - UEPG/PR – Presidente

Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa - Orientadora

Dra. Sílvia Daniele Rodrigues da Instituição Weill Cornell Medicine – Membro titular

Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre – Membro titular – UEPG/PR

## AGRADECIMENTOS

Primeiro, devo minha vida e todo o meu agradecimento as duas pessoas mais importantes que tenho em minha vida: minha amada mãe Raquel e meu querido pai Elias. Mesmo com todas as dificuldades financeiras e de saúde que passamos, sempre me incentivaram a nunca desistir de meus sonhos e principalmente dos estudos. Sempre digo e repetirei todo momento, este título é para vocês dois. Vocês são o que tenho de mais importante nesta vida. Tenho o orgulho e a sorte em poder chamá-los de “meus pais”. Amo muito vocês!

À minha amada orientadora cujo carinhosamente chamo de “minha mãe científica”, professora Michele. Essa professora, cientista e esse humano incrível. Agradeço por ter aceito, lá em 2018, para me orientar na iniciação científica e posteriormente no mestrado. Obrigado por ter me aberto as portas da ciência, por ter me moldado, me ensinado tantas coisas maravilhosas. Não apenas a ser um excelente professor/pesquisador, mas a ser um humano melhor. Saiba que levarei um pedacinho seu a todo lugar aonde for, e tenha a certeza que você mudou minha vida. Muito obrigado Professora!

Agradecimento especial à querida professora Márcia por ter, carinhosamente, aceito ser minha co-orientadora. Obrigado por ter compartilhado sua experiência profissional e ter me ajudado a aperfeiçoar cada vez mais meu trabalho. Professora Marcia, muito obrigado!

Aos meus queridos amigos, que estiveram a todo momento do meu lado aguentando meus desabafos e choros. Por compartilharem meus momentos felizes e momentos tristes.

As minhas amigas do grupo Dietrich: Carol e Mônica. E minhas amigas do laboratório M-55.

À técnica do laboratório M-55, Maria. Agradeço por todas as ajudas nas tarefas básicas do laboratório.

Agradeço aos professores do P.P.G. em Ciências Biomédicas, principalmente os da Biologia Celular e Molecular, por todo conhecimento e aprendizagem compartilhados e por não desistirem da Ciência. Agradecimento especial as professoras Iriane e Kátia.

Agradeço a agência CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, que fez com que esse sonho torna se possível.

## RESUMO

O antimônio (Sb) é um metaloide presente na natureza, pertencente à família 15 da tabela periódica, utilizado pela indústria de metais e farmacêutica. Por seu uso nas indústrias, a disponibilidade do antimônio na sua forma trióxido ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ) no ambiente tem aumentado. Portanto existe a preocupação com a contaminação humana por inalação e ingestão. Os efeitos citotóxicos do Sb causam alterações metabólicas como resultado das reações químicas, sendo o aumento na produção de ROS e o estresse oxidativo, levando a morte celular. Há poucas informações sobre os efeitos do antimônio no organismo. Diante da falta de dados sobre o efeito do Sb para o sistema nervoso, o presente estudo avaliou a viabilidade de uma linhagem de origem neuronal, o neuroblastoma humano (SH-SY5Y), exposta a diferentes concentrações de trióxido de antimônio ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ). As células foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e sem SFB. Em cada condição utilizou se diferentes concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (128 - 0,0625 $\mu\text{M}$ ). Avaliou-se ainda a viabilidade de fibroblasto murino (3T3) frente ao tratamento de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  nas mesmas concentrações. A viabilidade dessas células foi avaliada utilizando o método do MTT, vermelho neutro e sulforodamina B. O  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induziu aumento na viabilidade celular da linhagem de SH-SY5Y em concentrações de 0,25, 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$ , além de levar a morte celular nas concentrações de 1 a 128  $\mu\text{M}$ , efeitos verificados em 24, 48 e 72 h de exposição. Em células 3T3, os resultados era semelhante ao de SH-SY5Y. Além disto, utilizou-se o antioxidante (NAC), analisando se haveria redução em efeitos induzidos pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  nas células. Foi observado que o aumento da viabilidade quando células eram tratadas com as concentrações 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  era revertido na presença de NAC. Também, linhagem SH-SY5Y foi induzida à diferenciação com ácido retinóico para verificar efeitos do metaloide na linhagem diferenciada. As células SH-SY5Y diferenciadas mostraram ser resistentes aos efeitos do Sb. Os resultados obtidos demonstram que diferentes concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induzem respostas celulares distintas. O uso de antioxidante e a diferenciação podem ser mecanismos promissores contra os efeitos tóxicos causados por exposição ao antimônio.

**Palavras-chave:** Trióxido de Antimônio; Viabilidade Celular; Estresse Oxidativo; Antioxidante; Diferenciação celular.

## ABSTRACT

Antimony (Sb) is a metalloid present in nature, belonging to the 15th family of the periodic table, used by the metal and pharmaceutical industry. Due to its use in industries, the availability of antimony in its trioxide form ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ) in the environment has increased. Therefore, there is concern about human contamination by inhalation and ingestion. The cytotoxic effects of Sb cause metabolic changes as a result of chemical reactions, with an increase in ROS production and oxidative stress, leading to cell death. There is little information about the effects of antimony in the body. Given the lack of data on the effect of Sb on the nervous system, the present study evaluated the viability of a cell lineage of neuronal origin, the human neuroblastoma (SH-SY5Y), exposed to different concentrations of antimony trioxide ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ). Cells were cultured with DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and without FBS. In each condition, different concentrations of  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (128 - 0.0625 $\mu\text{M}$ ) were used. We also evaluated the viability of murine fibroblasts (3T3) against  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  treatment at the same concentrations. The viability of these cells was evaluated using the MTT, neutral red and sulforodamine B method.  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induced an increase in cell viability of the SH-SY5Y strain at concentrations of 0.25, 0.125 and 0.0625  $\mu\text{M}$ , in addition to leading to death cell in concentrations from 1 to 128  $\mu\text{M}$ , effects verified in 24, 48 and 72 h of exposure. In 3T3 cells, the results were similar to SH-SY5Y. In addition, the antioxidant (NAC) was used, analyzing whether there would be a reduction in the effects induced by  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  in the cells. It was observed that the increase in viability when cells were treated with concentrations 0.0625; 0.125; 0.25 and 0.5  $\mu\text{M}$  of  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  was reversed in the presence of NAC. Also, strain SH-SY5Y was induced to differentiate with retinoic acid to verify metalloid effects on the differentiated strain. Differentiated SH-SY5Y cells were shown to be resistant to the effects of Sb. The results obtained demonstrate that different concentrations of  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induce different cellular responses. Antioxidant use and differentiation may be promising mechanisms against the toxic effects caused by antimony exposure.

**Keywords:** Antimony Trioxide; Cell viability; Oxidative stress; Antioxidant; Cell differentiation.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Fluxograma esquemático dos materiais e métodos .....  | 19 |
| Figura 2- Representação esquemática da distribuição dos tratamentos na placa de 96 poços usada nos experimentos.....  | 22 |
| Figura 3- Efeito de $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y em 24, 48 e 72 horas de tratamento, meio suplementado com 10 % SFB.....  | 27 |
| Figura 4- Efeito de $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y em 24, 48 e 72 horas de tratamento, em meio sem SFB .....  | 28 |
| Figura 5- Efeito de concentrações (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 e 0.0625 $\mu M$ ) de $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y, em meio de cultivo suplementado com 10 % SFB.....       | 29 |
| Figura 6 - Efeito das concentrações 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 e 0.0625 $\mu M$ de $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y, em meio de cultivo sem SFB .....                         | 30 |
| Figura 7- Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y pela técnica de vermelho de neutro tratadas com $Sb_2O_3$ em meio suplementado com 10% SFB .....   | 31 |
| Figura 8 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y pela técnica de vermelho neutro tratadas com $Sb_2O_3$ em meio sem SFB .....  | 32 |
| Figura 9 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y tratada com $Sb_2O_3$ em meio de cultivo com 10% SFB pela técnica colorimétrica pelo Sulforodamina B .....                                  | 33 |
| Figura 10 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y tratada com $Sb_2O_3$ com meio sem SFB pela técnica colorimétrica por Sulforodamina B .....  | 34 |
| Figura 11 - Efeito do tratamento de $Sb_2O_3$ na viabilidade da linhagem 3T3 em meio de cultivo suplementado com 10 % SFB.....  | 35 |
| Figura 12 - Efeito do tratamento de $Sb_2O_3$ na viabilidade da linhagem 3T3 em meio de cultivo sem SFB .....   | 36 |
| Figura 13 - Ação do N-acetilcisteína (NAC) sobre o efeito do $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y durante 24 e 48 horas com o tratamento em meio de cultivo com 10 % SFB.....       | 38 |
| Figura 14 - Ação do N-acetilcisteína (NAC) sobre o efeito do $Sb_2O_3$ na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y durante tempo de 24 e 48 horas com o tratamento, em meio de cultivo sem SFB ..... | 40 |
| Figura 15 - Efeito de $Sb_2O_3$ na viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e não diferenciadas .....   | 42 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

3T3- Fibroblasto murino

AR- Ácido Retinóico

ATCC- Coleção americana de células para cultivo, do inglês – *The American Type Culture Collection*

BSO- DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HEPES – Ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanossulfônico)

IARC-Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

LDH- Enzima lactato desidrogenase

MTT – 3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio

NAC- N-acetil-cisteína

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês – *Phosphate Buffered Saline*

PET – Tereftalato de polietileno

pH – Potencial de hidrogênio

PVC – Cloreto polivinílico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RNA – Ácido ribonucleico

SFB- Soro Fetal Bovino

SH-SY5Y- Neuroblastoma Humano

SRB- Sulforodamina B

TCA- Ácido tricloroacético

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>11</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 11        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 11        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | <b>12</b> |
| 3.1      | ANTIMÔNIO CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E DISPONIBILIDADE ..  | 12        |
| 3.2      | TOXICIDADE .....  | 13        |
| 3.3      | ANTIMÔNIO E O ESTRESSE OXIDATIVO .....  | 17        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>19</b> |
| 4.1      | LINHAGEM CELULAR.....   | 20        |
| 4.2      | CULTIVO CELULAR.....  | 20        |
| 4.3      | SOLUÇÃO DE TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO ( $Sb_2O_3$ ) PARA USO <i>in vitro</i> .....   | 20        |
| 4.4      | DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE COLORIMÉTRICO COM BROMETO DE [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT).....                        | 21        |
| 4.5      | ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazino cloridrato) .....                     | 23        |
| 4.6      | ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR COLORAÇÃO PELO CORANTE SULFORODAMINA B [2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate] ..... | 24        |
| 4.7      | ENSAIO COM USO DO ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA (NAC).....  | 25        |
| 4.8      | VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS COM ÁCIDO RETINÓICO ( $C_{20}H_{28}O_2$ ).....   | 25        |
| 4.9      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 26        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>26</b> |
| 5.1      | EFEITO NA VIABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y NAS CONCENTRAÇÕES DE $Sb_2O_3$ NA POR 24, 48 E 72 HORAS.....  | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO $Sb_2O_3$ NA VIABILIDADE CELULAR LINHAGEM DE FIBROBLASTO MURINO (3T3) EM 24, 48 E 72 HORAS. ....         | 34        |
| 5.3 AÇÃO DO ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE OS EFEITOS NA VIABILIDADE CELULAR CAUSADOS PELO TRATAMENTO DE $Sb_2O_3$ ..... | 37        |
| 5.4 EFEITO DO $Sb_2O_3$ NAS CELULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS COM ÁCIDO RETINÓICO EM COMPARAÇÃO COM CÉLULAS NÃO DIFERENCIADAS.....      | 41        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O antimônio é um elemento químico de símbolo Sb presente na natureza na forma sólida. Seu uso é frequente pela indústria de metais e farmacêutica, sendo a aplicação industrial deste composto bastante abrangente. A forma mais utilizada de Sb é a forma trióxido, e seu uso vem acarretando em um elevado aumento de sua disponibilidade no ambiente, levando a contaminação humana pela inalação e ingestão, causando efeitos nocivos ao corpo.

Estudos *in vitro* com diferentes tipos celulares, tumorais e não tumorais, demonstram que o Sb leva a morte celular e acarreta alterações no material genético. Dados sobre sua neurotoxicidade ainda são escassos, apenas encontra-se informações de seu análogo químico o Arsênio (As). Alterações metabólicas e processos neurodegenerativos são efeitos neurotóxicos causados pelo As. Estas alterações demonstram ter interferência do As nas funções de células neuronais. Ocorrendo mudanças no metabolismo de neurotransmissores, modificações em sinapse e apoptose neuronal.

Por haver similaridade química entre o As e o Sb, há a possibilidade de o antimônio induzir os mesmos efeitos no organismo. Sabendo da contaminação humana por Sb e pela insuficiência de dados sobre a toxicidade deste composto, sobretudo os danos em células neuronais, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito tóxico do  $Sb_2O_3$  em linhagem de origem neuronal. Com este objetivo, selecionamos a linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), devido ser uma linhagem modelo para estudos de neuropatologias. A célula SH-SY5Y corresponde a uma linhagem tumoral. Como parâmetro comparativo, a célula de fibroblasto murino (3T3) foi escolhida por sua característica em ser uma linhagem não tumoral.

Por haver estudos confirmando que o Antimônio induz, como resultado de processos metabólicos, em células a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente estresse oxidativo, utilizamos um antioxidante (NAC) para verificar se o Sb estaria relacionado a produção de ROS na linhagem escolhida. As linhagens de neuroblastoma diferenciadas assemelham-se a neurônios, com características únicas deste tipo celular. Assim, induziu-se a célula SH-SY5Y a diferenciação utilizando ácido retinóico, para aferir o efeito do  $Sb_2O_3$  neste grupo celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações de  $Sb_2O_3$  sobre neuroblastoma humano (SH-SY5Y) durante 24, 48 e 72 horas de exposição.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade celular da linhagem tumoral SH-SY5Y frente a diferentes tempos e concentrações de  $Sb_2O_3$ ;
- Analisar se diferentes concentrações testadas de  $Sb_2O_3$  também interferem na viabilidade da linhagem não tumoral 3T3 (fibroblasto murino);
- Verificar a interferência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) sobre o tratamento com  $Sb_2O_3$  na célula SH-SY5Y;
- Comparar a viabilidade de células SH-SY5Y submetidas a diferenciação com ácido retinóico e tratadas com  $Sb_2O_3$  com as células não diferenciadas;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ANTIMÔNIO CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E DISPONIBILIDADE

O Antimônio, metaloide classificado como semimetal da família 5A (grupo 15) da tabela periódica e número atômico 51, apresenta massa atômica de 121,76 g/mol, densidade de 6.697 Kg/m<sup>3</sup> em temperatura de 26°C além de apresentar 6 formas alotrópicas sendo apenas uma estável. Seu estado físico, em ambiente natural à 25° C, é sólido com coloração branco prateado cristalino, encontrado naturalmente na crosta terrestre, tendo abundância de 0,2 a 0,5 mg/kg<sup>-1</sup>. Sua nomenclatura originou-se do latim, que representa uma de suas principais características, “*Stibium*” metal não encontrado sozinho (ANDERSON, 2012; SADEGHI, 2010).

Elemento classificado geoquimicamente como calcófilo, o antimônio apresenta tanto características dos metais quanto dos ametais sendo encontrado coexistindo junto a outros elementos, principalmente com seu análogo químico o arsênio (As) por compartilharem características físico-químicas semelhantes (ARAI, 2010; HERATH et al., 2017; WILSON et al., 2010).

A configuração eletrônica do Sb, [Kr] 4d<sup>10</sup> 5s<sup>2</sup> 5p<sup>3</sup>, ocorre por haver elétrons desemparelhados nas suas últimas camadas permitindo-o apresentar diferentes estados de oxidação. Os principais estados de oxidação do Sb encontrados no ambiente são antimonitos inorgânicos (III) e antimoniatos (V) (ANDERSON, 2012; HERATH et al., 2017; MATSUBARA, 2011; NERI, 2014).

Sua disponibilidade vem aumentando desde o primeiro relato sobre a presença no ambiente. Esse aumento se deve, em grande parte, pelas atividades antropogênicas, principalmente as da indústria metalúrgica e mineradora (COOPER et al., 2009; KING et al., 2005; SHIMAMOTO et al., 2011). No ambiente, o Sb é produzido naturalmente sendo resultado de atividades do próprio ambiente como vulcanismo, intemperismo, através de processos erosivos, solos e sedimentos e em água subterrânea (HE et al., 2007; LEUZ et al., 2006).

A utilização do Sb pelas indústrias de mineração tornou-se um dos principais fatores para o aumento da disponibilidade deste composto no ambiente, sendo a atividade humana a forma predominante de disponibilização. Na indústria, o

antimônio é bastante utilizado como retardador de chamas, em adesivos, em resinas plásticas, como catalisador para produção de garrafas e embalagens PET (Polietileno Tereftalato), em baterias de armazenamento de chumbo e em lubrificante sólido em pastilhas de freio (COOPER et al., 2009; HE et al., 2018).

O uso em pastilhas de freio como um lubrificante sólido se tornou uma das principais formas de contaminação de Sb na atmosfera. Durante o processo de frenagem é possível que haja um aquecimento pelo aumento da temperatura das pastilhas de freio, fazendo que o Sb reaja ou oxide. Este processo é a principal fonte de contaminação de  $Sb^{3+}$  e  $Sb^{5+}$  na atmosfera (CANEPARI et al., 2010; MARTINZEZ, ECHEBERRIA, 2016; VARRICA et al., 2013).

O Antimônio também é utilizado pela indústria farmacêutica. O uso como principal componente de produtos medicinais e cosméticos já era descrito desde a antiguidade. Há registros do seu uso em sua forma  $Sb^{5+}$  desde o século XIX, sendo usado o antimônio misturado com tartarato e potássio. Sua aplicação era realizada como o antimonil tartarato de potássio conhecido na época para tratamento de febres e doenças parasitárias e microbianas (HADJIKAKOU et al., 2015). Atualmente, o antimônio é utilizado no tratamento de todas as formas de leishmaniose e esquistossomose, encontrado sendo o principal componente do medicamento para estas doenças (HADJIKAKOU et al., 2015; QUARESMA; RUGANI, 2018).

### 3.2 TOXICIDADE

O Antimônio é emitido no ambiente através dos processos antrópicos e biogeoquímicos. Este metaloide acaba passando por processos de oxirredução, seja em meios orgânicos e inorgânicos, mudando sua forma e podendo então exercer vários efeitos tóxicos no ambiente. No ambiente, se estabelece em sedimentos, apresenta-se junto com metais alcalinos, resultando em minerais estáveis tornando-se um risco potencialmente significativo para a saúde (HE et al., 2018; REN et al., 2019; WILSON et al., 2010). O Sb é apontado como contaminante da água potável acondicionado em garrafas PET, por seu uso na fabricação das mesmas. A contaminação de água potável acondicionada em embalagens PET ocorre através do processo geofísico de lixiviação. Onde o Sb sai do material PET para a água,

podendo a quantidade aumentar em 90% se comparada com a quantidade inicial, se a água ficar armazenada por 6 meses nestas embalagens (SHOTYK et al., 2006, 2007; SHIMAMOTO et al., 2011).

Outra maneira de tornar –se um risco à saúde está no acúmulo em plantas presentes em solos onde há aumento elevado na concentração de antimônio, causado por fatores abióticos e atividade antrópica. Além de ser tóxico as plantas por causar variações drásticas nas concentrações de nutrientes essenciais para sobrevivência, pode contaminar os demais seres vivos que entram em contato com estas plantas, desde micro-organismos até animais de grande porte, incluído os seres humanos pela alimentação (SHTANGEEVA; BALI; HARRIS, 2011).

Os seres humanos podem ser expostos ao Sb através do ar, da poeira, bebendo água engarrafada em embalagem PET, por alimentos, pela exposição ao tabaco, a carpetes e tecidos tratados com materiais ignífugos, esmaltes cerâmicos e plásticos (BELZILE; CHEN; FILELLA, 2011; TRIVELIN et al., 2006). Dependendo do tempo de exposição ao Sb, pode ocorrer intoxicação aguda ou crônica. Os efeitos agudos são descritos principalmente sendo irritabilidade nas mucosas digestivas e respiratórias, além de vômitos, desidratação, hipotermia e aumento da pressão arterial (RATH et al., 2003; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Na contaminação crônica, por maior tempo de exposição, o Sb concentra-se em órgãos vascularizados e tecidos no geral, principalmente no fígado, rins, baço e no sangue. Ainda a exposição prolongada ao Sb compromete gravemente o sistema respiratório e cardiovascular (HERATH; VITHANAGE; BUNDSCHUH, 2017). Apresenta ainda, efeitos cardiopatológicos crônicos como fibrilação atrial, nefrite hemorrágica e efeitos hepáticos. A utilização de fármacos a base de Sb para o tratamento de doenças parasitárias tem sido responsável por distúrbios neurológicos crônicos como cefaleia, irritabilidade excessiva, tremores entre outros (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Além destes fatores, o Sb é considerado um possível agente clastogênico causando danos aos cromossomos das células, além de haver a possibilidade de ser um agente carcinogênico (COSTA, 2016; TRIVELIN et al., 2006).

O Sb compartilha características químicas similares ao Arsênio (As), apenas sendo menos reativo. Mesmo apresentando semelhanças físico-químicas com o As, o Sb é 10x menos abundante na crosta terrestre (ANDERSON, 2012; HERATH et al., 2017). Ambos os semimetais, As e Sb, são estudados para confirmar seus

efeitos citotóxicos *in vitro* e *in vivo*. Já foi comprovado que tanto o Sb quanto o As e suas diferentes espécies induzem carcinogenicidade em humanos e estão intimamente ligados com a piora no quadro clínico. Porém ainda são escassos os trabalhos sobre esse possível efeito causado pelo Sb (BAILEY et al.; KUROSAWA, et al.; MULTANI et al., 2016).

O Sb, o As e demais compostos inorgânicos relacionados são categorizados, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), como compostos com potencial carcinogênico. Estes compostos carcinogênicos têm a capacidade de induzir e promover o desenvolvimento de câncer por meio de mecanismos moleculares como a expressão gênica anormal, estresse oxidativo por produção exacerbada de ROS, inibição dos reparos ao material genético, e morte celular (BERNARDINI, et al. 2017; LOU et al., 2021; SONG, 2015).

Dependendo da concentração de exposição ao Sb diferentes respostas celulares podem ser observadas como apoptose, alterações metabólicas, morte celular, proliferação e modificações genéticas (BOREIKO et al., 2021; JIANG et al., 2021; WAN et al., 2021; ZHANG et al., 2018). Em concentrações maiores que 4  $\mu\text{M}$ , as células sofrem apoptose através de reações químicas que ocorrem pela presença deste metalóide. Além de apoptose, concentrações menores que 0,8  $\mu\text{M}$  de Sb levam células a sofrer modulações e progressão, tanto em câncer de próstata quanto em câncer de bexiga. Essas modulações e progressões no câncer de próstata e bexiga foram confirmadas através de resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*. O antimônio pode promover ainda, o crescimento tumoral imitando a atividade androgênica em células de câncer de próstata dependentes de androgênio (ZHANG et al., 2018; LOU et al., 2021). O Sb apresenta ainda ação nefrotóxica, dando apoio a esta observação, um estudo com células epiteliais tubulares renais murino (TCMK-1) mostrou uma queda expressiva na viabilidade e um aumento no teor da enzima lactato desidrogenase (LDH) (WAN et al., 2021).

Células troncos embrionárias de camundongos cultivadas *in vitro* e expostas a concentrações menores que 1,3  $\mu\text{M}$  de Sb (III) apresentam alterações no material genético, demonstrando assim que o Sb possui propriedades genotóxicas (BOREIKO et al., 2021). Já em espermatozoides e células germinativas de camundongos expostos a concentrações menores que 0,15  $\mu\text{M}$  de Sb, houve diminuição no número de células. Além disso, houve um aumento na taxa de malformação e de vacúolos intracelulares. As células tronco embrionárias, os

espermatozoides e células germinativas apresentaram processos anormais de autofagia e apoptose desencadeados pelo Sb (BOREIKO et al., 2021; WU et al., 2021).

Alterações histopatológicas causadas pelo Sb podem ocorrer no tecido cardíaco, renal e de próstata. Estas alterações histopatológicas são induzidas após a exposição de concentrações de Sb. Em tecido cardíaco e tecido renal estas alterações apresentam-se em concentrações superiores a 5  $\mu\text{M}$  de Sb (JIANG et al., 2021; WAN et al., 2021). Como resultado da contaminação por Sb, acaba ocorrendo morte celular, estresse oxidativo e alteração no metabolismo normal de organelas como: mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomo; além de mutações e danos genéticos (JIANG et al., 2021; WAN et al., 2021; ZHANG et al., 2018).

Estudos tem mostrado danos neuronais causados por exposição ao Sb. Em astrócitos, quando foram expostos ao Sb, foi possível observar um aumento na síntese de óxido nítrico e da proteína glial fibrilar ácida, ambos marcadores proteicos e chaves do processo de astrogliose reativa que são mudanças fisiológicas de origem inflamatória que astrócitos podem exibir em resposta a diversas condições patológicas. Em células feocromocitoma de rato (PC12) e nos astrócitos, a exposição ao Sb leva a morte celular (ZHENG et al., 2021; ZHI et al., 2020).

Para comparação, o arsênio (As), metaloide que compartilha semelhanças físico-químicas com o Sb, promove seus efeitos neurotóxicos que podem se correlacionar com mecanismos moleculares que estão associados a processos neurodegenerativos (LOMBÓ et al., 2019; MEDDA et al., 2021). As citocinas pró-inflamatórias e a proteína precursora de amiloide tem seus níveis aumentados em astrócitos expostos ao arsênio. Ainda, a neurotoxicidade associada ao As induz alterações no metabolismo de neurotransmissores, causando modificações em sinapses (CASTRO et al., 2011; NELSON-MORA et al., 2018).

Estudos epidemiológicos relatam a correlação da exposição ao As com anormalidades neurodegenerativas e no neurodesenvolvimento. Estudos *in vitro* afirmam que o As tem influência direta na redução da neurogênese, além de alterações no processo de diferenciação de células-tronco (SZYMKOWICZ; SIMS, 2019).

A exposição ao As prejudica o desenvolvimento de neurônios sensoriais durante a embriogênese. No epitélio olfativo a exposição ao As modifica a diferenciação e proliferação de células-troncos humanas, quanto maior o tempo de

exposição mais significativo são estas alterações. Ainda, esta exposição prejudica e modifica a diferenciação celular e aumenta o nível da expressão de proteínas Caderinas em células tronco embrionárias, de linhagem de camundongos P-19, fazendo estas células se unirem em aglomerados. Em situações normais, os níveis destas proteínas de adesão (célula-célula), são regulados pela própria célula (McMICHAEL, et al. 2021; SZYMKOWICZ; SIMS, 2019). O As ainda levou ao aumento nos níveis extracelulares de glutamato da micróglia de camundongos e um desequilíbrio nos níveis de cistina/glutamato gerando morte de neurônios (LOMBÓ et al., 2018; SIGH et al., 2016).

Pela similaridade química entre o arsênio com o antimônio é possível que o Sb induza esses mesmos efeitos no sistema nervoso sendo necessários mais estudos confirmando a toxicidade do Sb no sistema nervoso. Por este motivo o presente trabalho tem como linhagem celular escolhida a SH-SY5Y, linhagem usada como um modelo para estudo de funcionamento de neurônios e de patologias relacionadas ao sistema nervoso (LOPES et al., 2010; XIE et al., 2010).

### 3.3 ANTIMÔNIO E O ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo que é gerado por radicais livres de oxigênio (ROS) pode provocar modificações altamente prejudiciais para a vida celular (MANN et al., 2006; LOSLER et al., 2009). Além de mutações, evidencia –se a participação das ROS nas vias de sinalização celular que estão diretamente envolvidas com a regulação do crescimento celular (VALKO et al., 2006). O estresse oxidativo pode gerar mudanças no metabolismo celular e modificar proteínas (VALKO et al., 2004), danificar a mitocôndria além de diminuir a ubiquitinação de proteínas e inativar o proteossoma (WU et al., 2010). Estes eventos estão relacionados com alterações morfofisiológicas das células o que pode levar ao desenvolvimento de câncer e morte celular. Assim o estresse oxidativo pode ser um biomarcador válido para o câncer (COSTA, 2016; VALKO et al., 2004; 2006; WU et al., 2010; 2021).

A produção de ROS pelas células é resultado do metabolismo energético, porém a célula possui sistemas antioxidantes de proteção que mantém o equilíbrio. Mas quando as células são expostas a compostos, como a exemplo os semi-metais, o nível de ROS acaba sendo elevado e os sistemas antioxidantes acabam não

sendo suficiente, o que ocasiona a toxicidade e ao processo de carcinogênese. O aumento nas ROS produzidas pelas células em resposta a exposição ao Sb já é estabelecido pela literatura sendo uma das grandes responsáveis pela toxicidade celular deste composto. (HARRIS; SHI, 2003; LEONARD; BOWER; SHI, 2004; MANN et al., 2006).

O Sb pode desencadear mudanças drásticas no metabolismo celular, altas concentrações (entre 8 a 200  $\mu\text{M}$ ) induzem um aumento na carga oxidativa da célula, levam a peroxidação lipídica, além de lesões em organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e autofagossomos (LOU et al., 2021; SU et al., 2022; TIMERNSTEIN et al., 1995; VERDUGO et al., 2016; ZHONG et al., 2021).

Estresse oxidativo gerado como resultado do aumento na produção de ROS pelas células que são expostas ao antimônio, apresenta se como mecanismo subjacente à toxicidade do composto. Efeitos desta toxicidade acabam desenvolvendo respostas celulares, como a apoptose, ciclo celular anormal e alterações no material genético. Alterações no metabolismo celular causadas pela toxicidade do Sb são descritas em diferentes tipos celulares, seja células tumorais ou não tumorais, como: células embrionárias, células epiteliais renais, células germinativas e hepatócitos (AL-GUBORY, 2014; BOREIKO et al., 2021; PHANIENDRA et al., 2015; WU et al., 2021; TRIVELIN et al., 2006).

Células de leucemia mieloide aguda (HL60) expostas a concentrações acima de 40  $\mu\text{M}$  de antimonil tartarato de potássio demonstram, além de inibição no crescimento celular, uma elevada produção de ROS (LECUREUR et al., 2002). Já em células HEK-293 expostas a espécies trivalentes de Sb, este aumento expressivo na produção de ROS ocorre em concentrações superiores a 8  $\mu\text{M}$  (JIANG et al., 2016).

O aumento na produção de ROS pelo Sb induziu hepatotoxicidade em camundongos. Após interferir no metabolismo lipídico, a exposição ao antimônio levou a mitofagia nos tecidos hepáticos (ZHONG et al., 2021). Como sendo resultado a este aumento na geração de ROS após exposição ao Sb, tem-se uma alta nos níveis de morte celular nestas linhagens (LECUREUR et al., 2002; LÖSLER et al., 2006; SU et al., 2022; VALKO et al., 2006; VERDUGO et al., 2016).

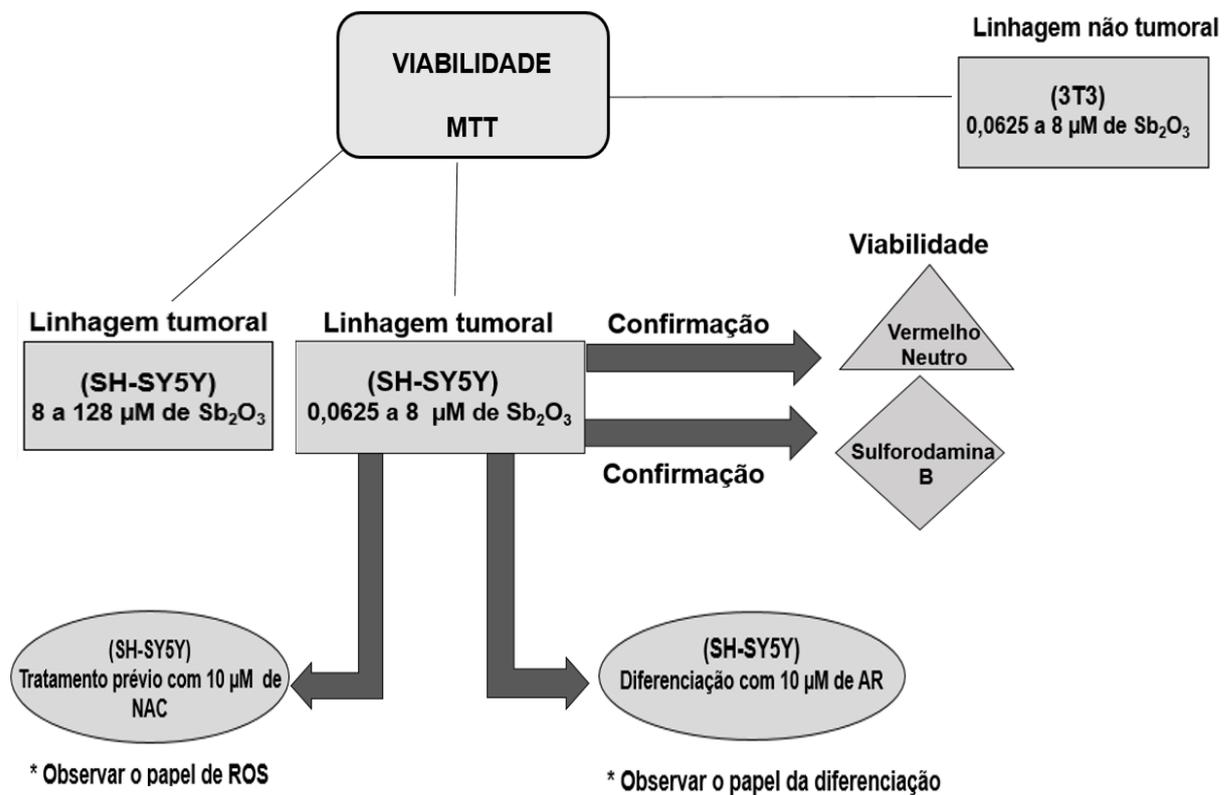
Todos estes processos de morte celular descritos, sendo resultados do aumento na produção de ROS, estão associados principalmente à perda no potencial mitocondrial, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, e a ativação

excessiva de proteases Caspases, como uma resposta celular a exposição por Sb (AL-GUBORY, 2014; LÖSLER et al., 2006; LECUREUR et al., 2002; MANN et al., 2005; ZHONG et al., 2021).

Apesar de haver dados demonstrando as respostas celulares causadas pelo aumento na produção de ROS e estresse oxidativo causados pelo Sb em diferentes tipos celulares, os dados em células neuronais ainda são insuficientes. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo entender como células de neuroblastoma SH-SY5Y comportam-se frente a exposição ao Sb.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1- Fluxograma esquemático dos materiais e métodos



Fonte: O autor

Nota: Fluxograma de materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. As técnicas utilizadas para avaliar a viabilidade da linhagem celular SH-SY5Y e 3T3 após exposição a concentrações de 128 a 8  $\mu\text{M}$  e 8 a 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foram: MTT (padrão), e para confirmação a coloração por vermelho neutro e sulforodamina B. Em seguida, foi avaliada a viabilidade celular após o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  do antioxidante (NAC). Para induzir a linhagem SH-SY5Y a diferenciação, foi utilizado 10  $\mu\text{M}$  de ácido retinóico posteriormente expor a célula nas concentrações de 8 a 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

#### 4.1 LINHAGEM CELULAR

Com intuito de avaliar a citotoxicidade do  $Sb_2O_3$  utilizou-se duas linhagens celulares: linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) procedente de uma linhagem celular subclonada originária de células tumorais, proveniente da medula óssea de um neuroblastoma de uma criança com idade de 4 anos; e a linhagem celular do tipo fibroblasto murino (3T3) isolada do tecido embrionário de camundongo (dados retirados do ATCC). As células fazem parte do acervo de linhagens celulares pertencente ao Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia, M-55, do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As linhagens foram mantidas em congelamento em ultrafreezer à temperatura - 80°C do laboratório de Histopatologia e Cultura celular, M-13.

#### 4.2 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares de SH-SY5Y e 3T3 foram mantidas em cultivo utilizando meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*- Gibco) alta glicose (4,5 g/L), contendo antibiótico (100 µL/mL de penicilina; 100 µg/L de estreptomicina); 2,5 g/L do agente tamponante HEPES {(ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanossulfônico)} e 3,7 g/L de Bicarbonato de Sódio ( $NaHCO_3$ ). Foi adicionado ao meio de cultivo DMEM, 10 % SFB (Gibco). As células foram mantidas em uma incubadora à 37°C em 5%  $CO_2$ , sendo realizado 3 repiques semanais.

#### 4.3 SOLUÇÃO DE TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO ( $Sb_2O_3$ ) PARA USO *IN VITRO*

A solução do trióxido de antimônio ( $Sb_2O_3$ ) para a utilização em cultivo, foi feita através da diluição do  $Sb_2O_3$  em ácido clorídrico (HCL) fumegante a 37% obtendo uma concentração de 0,25M de  $Sb_2O_3$ . Esta diluição em HCL fez-se necessária em razão do  $Sb_2O_3$  ser um composto insolúvel em água (0,0287 g/L em 20° C), de acordo com a ficha de dados de segurança do composto (SIGMA-ALDRICH, 2022).

Para a utilização nos tratamentos com as linhagens a solução de 0,25M de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foi diluída em meio DMEM com 10% SFB e em meio DMEM sem SFB com concentração final de 128 e 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Posteriormente, a partir da solução 128 e 8  $\mu\text{M}$  foram realizadas diluições seriadas com intuito de obter as demais concentrações utilizadas nos experimentos. As concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  utilizadas nos tratamentos foram: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$ . As soluções contendo o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  eram preparadas no dia que seriam usadas.

Os meios de cultivo com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  utilizado para os tratamentos e no controle eram preparados exclusivamente para os experimentos, contendo 5,95 g/L do agente tamponante HEPES. Nos primeiros experimentos, os quais o meio de DMEM usado tinha sido preparado com 2,5 g/L de HEPES, notou-se que houve morte celular, e o meio apresentou coloração anormal.

Ao analisar o pH, verificou-se acidez do meio com o tratamento, sendo pH de 5,93 no tratamento contendo 10% SFB e pH de 6,53 sem SFB. Assim, para o preparo da solução de meio para os tratamentos com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , padronizamos a quantidade de 5,95 g/L de HEPES.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE COLORIMÉTRICO COM BROMETO DE [3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2YL)-2,5-DIFENIL TETRAZOLIUM] (MTT)

Para avaliar a viabilidade celular das linhagens,  $1 \times 10^4$  células da linhagem SHSY-5Y e  $3 \times 10^3$  da linhagem 3T3 por poço, foram plaqueadas em placas de 96 poços (KASVI) contendo meio DMEM acrescido de 10 % SFB e mantidas nessa condição por 24 horas, a 37°C, em incubadora a 5%  $\text{CO}_2$ . Após as 24 h do plaqueamento, retirou-se o meio de cultivo e foram adicionados os tratamentos com as diferentes concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio DMEM contendo 10 % SFB ou sem SFB (Figura 2). Este procedimento foi realizado em 3 placas de 96 poços, sendo cada uma para os 3 tempos de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  avaliados neste estudo, 24, 48 e 72 horas.

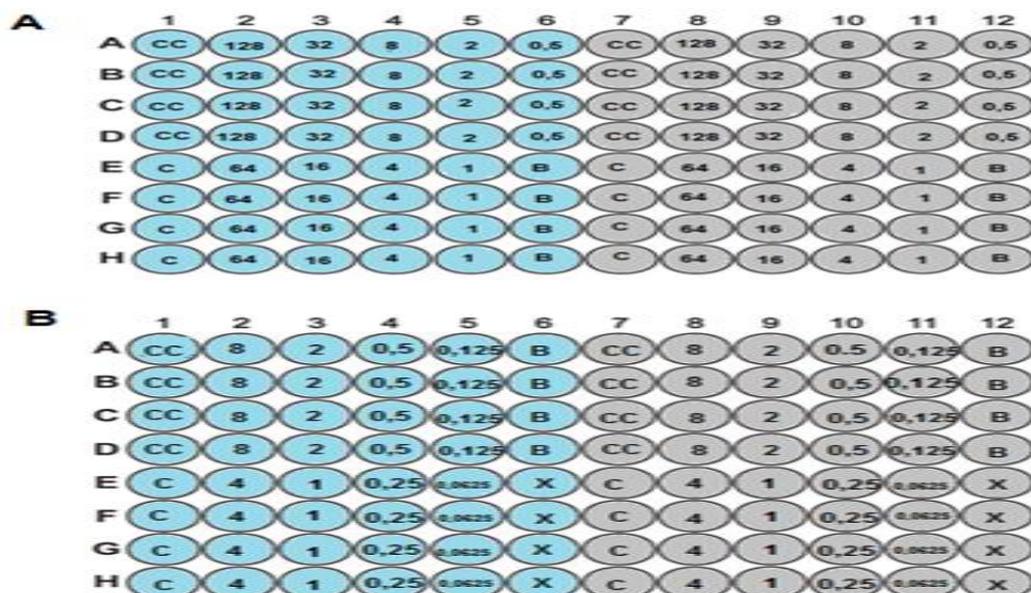
No controle dos experimentos foi usada a mesma solução utilizada para diluir o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  ou seja, HCl 37% fumegante. O volume de HCl 37% foi o mesmo usado da solução  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  0,25M para preparar a maior concentração de cada

experimento. Por exemplo: no experimento em que foi usado como maior concentração 128  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , utilizou 1,7 $\mu\text{L}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  0,25M em 3,2 mL de meio DMEM (com ou sem SFB). A solução controle foi preparada usando 1,7  $\mu\text{L}$  de HCL 37% em 3,2 mL de meio DMEM e essa solução adicionada aos poços denominados de controle.

Nos poços onde não havia células foi adicionado 200  $\mu\text{M}$  da solução de maior concentração de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  utilizada nos tratamentos, 128  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ , sendo denominado de branco. O branco tinha a finalidade de remover a interferência que o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  poderia causar no resultado das absorvâncias analisadas, sendo este valor (média do branco) usada no cálculo da viabilidade (equação abaixo).

O período de exposição das linhagens celulares com as concentrações determinadas de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foi de 24, 48 e 72 horas. Os poços de cada concentração de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , controle e veículo foram feitos em quadruplicadas. Cada placa de 96 poços utilizada (placa 24 horas, placa 48 horas e placa 72 horas) foi organizada para que 48 poços fossem destinados aos tratamentos com meio DMEM 10 % SFB e 48 poços para tratamentos meio DMEM sem SFB, como podemos ver na Figura 2, respeitando o tempo de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Figura 2- Representação esquemática da distribuição dos tratamentos na placa de 96 poços usada nos experimentos.



Fonte: O autor

Nota: Esquemas das placas utilizadas nos experimentos, figura 2(A) concentrações de 128 a 0,5  $\mu\text{M}$  e 2(B) concentrações 8 a 0,0625  $\mu\text{M}$ . Coloração azul claro representa divisão da placa com meio

DMEM 10%SFB. Em coloração cinza corresponde a divisão da placa contendo meio DMEM na ausência de SFB. Sendo CC controle do cultivo (células em condições de cultivo a 10% SFB ou sem SFB), C correspondem aos poços em que as células foram mantidas com o volume do veículo na maior concentração de Sb usada, e B (branco) poços sem células contendo a solução da maior concentração de Sb usada. Em (X) os poços não utilizados.

Passado o período de exposição ao  $Sb_2O_3$ , o meio com os tratamentos foi retirado e adicionado a cada poço 50  $\mu$ L do reagente MTT (0,5 mg/mL) e posteriormente as placas foram incubadas por 3 horas à 37°C em 5% de  $CO_2$ . Após o tempo de incubação com o MTT, a solução foi retirada dos poços e em seguida adicionado a cada poço 100  $\mu$ L de sulfóxido de dimetil (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. Cristais de formazan são precipitados de cor arroxeada que se formam a partir da redução do reagente de MTT (cor amarela) pelas células que se encontram metabolicamente viáveis (VERMA et al., 2020; FRESHNEY, 2005).

A leitura das placas para determinação da absorbância foi medida por um espectrofotômetro de microplacas Biotek Elx 800 em comprimento de onda de 570nm. Para a realização da análise estatística foram feitos 3 experimentos independentes. O cálculo utilizado para determinação da viabilidade foi realizado através da equação abaixo:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{(\text{Média da Absorbância das concentrações de } Sb_2O_3 - \text{média do branco})}{(\text{Média da Absorbância dos controles} - \text{média do branco})} \times 100$$

#### 4.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (3-AMINO-7-DIMETILAMINO-2-METILFENAZINO CLORIDRATO)

A linhagem celular SH-SY5Y foi cultivada em placas de 96 poços e tratada com diferentes concentrações de antimônio (descrito no item 4.3). Após a incubação com o Sb, os poços foram esgotados e lavados com 200  $\mu$ L de PBS e incubados com 100  $\mu$ L da solução de vermelho neutro (40  $\mu$ g/mL) por 3 horas em estufa de  $CO_2$  a 37 °C para que ocorresse a internalização do vermelho neutro.

Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de solução fixadora (formol 10% em 0,1M de CaCl<sub>2</sub>). Os cristais de vermelho neutro foram solubilizados com 100 µL de solução eluente (ácido acético 10%, etanol 50%), método utilizado com alterações de Borenfreund e Puerner (1985) e Arhamed e Alhadlaq (2014). A absorbância foi medida com o auxílio do espectrofotômetro de microplacas (Biotek Elx 800) em comprimento de onda de 520nm e submetida ao cálculo de viabilidade celular descrito no item 4.4. Para a realização da análise estatística, foram feitos 3 experimentos independentes com quadruplicatas por condição testada.

#### 4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR COLORAÇÃO PELO CORANTE SULFORODAMINA B [2-(3-DIETHYLAMINO-6-DIETHYLAZANIUMYLIDENE-XANTHEN-9-YL)-5-SULFO-BENZENESULFONATE]

A linhagem SH-SY5Y foi cultivada em placas de 96 poços, sendo tratadas com as concentrações de antimônio já descritas no item 4.3. Para este ensaio adaptamos o protocolo a partir de Papazisis e seus colaboradores (1997). Neste ensaio utilizou os tempos de 24 e 48 horas, passado o tempo de exposição o meio de cultivo de cultivo contendo os tratamentos foram retirados e os poços lavados 1x com PBS. Posteriormente foi adicionado 100 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA), solução usada para fixação das células, e levado a geladeira por 30 minutos. Após os 30 minutos, o TCA foi retirado e os poços foram lavados por 5x com 200 µL de água destilada tipo I, e deixadas viradas para baixo por 24 horas em temperatura ambiente com finalidade que ocorresse a secagem.

Após os poços estarem secos, foi adicionado a cada poço 40 µL da solução de SRB 0,2% (0,02 g em 10 mL de ácido acético 1%) e deixado por 30 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo, a solução de SRB foi retirada e os poços lavados 5x com 200 uL de ácido acético 1%. Em seguida, 10 uL de TrisBase 10 mM (preparado em água) foi adicionado em cada poço e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas (Biotek Elx 800) em comprimento de onda de a 432 e 620 nm.

Para esta técnica foram feitos dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através da média das absorbâncias dos 2 experimentos

independentes e posteriormente a subtração dos 2 comprimentos de onda, o valor deste resultado submetido ao cálculo de viabilidade descrito no item 4.4.

#### 4.7 ENSAIO COM USO DO ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA (NAC)

Para a realização deste ensaio, os tratamentos com as diferentes concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$ ) foram preparados em meio DMEM 10% SFB ou em meio sem SFB acrescido de 10 mM do antioxidante NAC. Após 24h do plaqueamento, metade da placa de 96 poços recebeu o tratamento com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio de cultivo 10% SFB ou sem SFB. A outra metade recebeu o tratamento com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio de cultivo 10% SFB ou sem SFB acrescido de NAC. Para este ensaio foram escolhidos os tempos de 24 e 48 horas de exposição.

Passado o tempo de exposição (24 e 48 horas), o tratamento foi retirado das placas e procedeu-se com a técnica do MTT e subsequente leitura como descrito no item 4.4. Foram realizados 3 experimentos independentes com quadruplicatas para cada concentração testada.

#### 4.8 VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS COM ÁCIDO RETINÓICO ( $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$ )

As células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 96 poços, sendo  $5 \cdot 10^3$  células por poço e mantidas por 24 horas em incubadora a  $37^\circ\text{C}$ . Decorrido o tempo, foi retirado o meio de cultivo DMEM e adicionado o tratamento com 10 mM de ácido retinóico (AR) (100  $\mu\text{L}$  por poço) diluído em meio DMEM 10% SFB e meio sem SFB. No meio DMEM contendo 10 mM de ácido retinóico (10% SFB ou sem SFB) foi diluído o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na concentração final de 8  $\mu\text{M}$  que foi submetida a diluição seriada para obtenção das concentrações 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  determinadas. O tempo escolhido para o tratamento com as concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e ácido retinóico foi de 24 horas. Passado o tempo de incubação com o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foi realizada a técnica do MTT.

A absorbância foi medida com auxílio do espectrofotômetro de microplacas (Biotek Elx 800) em comprimento de onda de 520nm e submetida ao cálculo de viabilidade celular descrito no item 4.4. Para este ensaio, foram realizados 3

experimentos independentes com quadruplicatas para cada concentração por condição testada.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

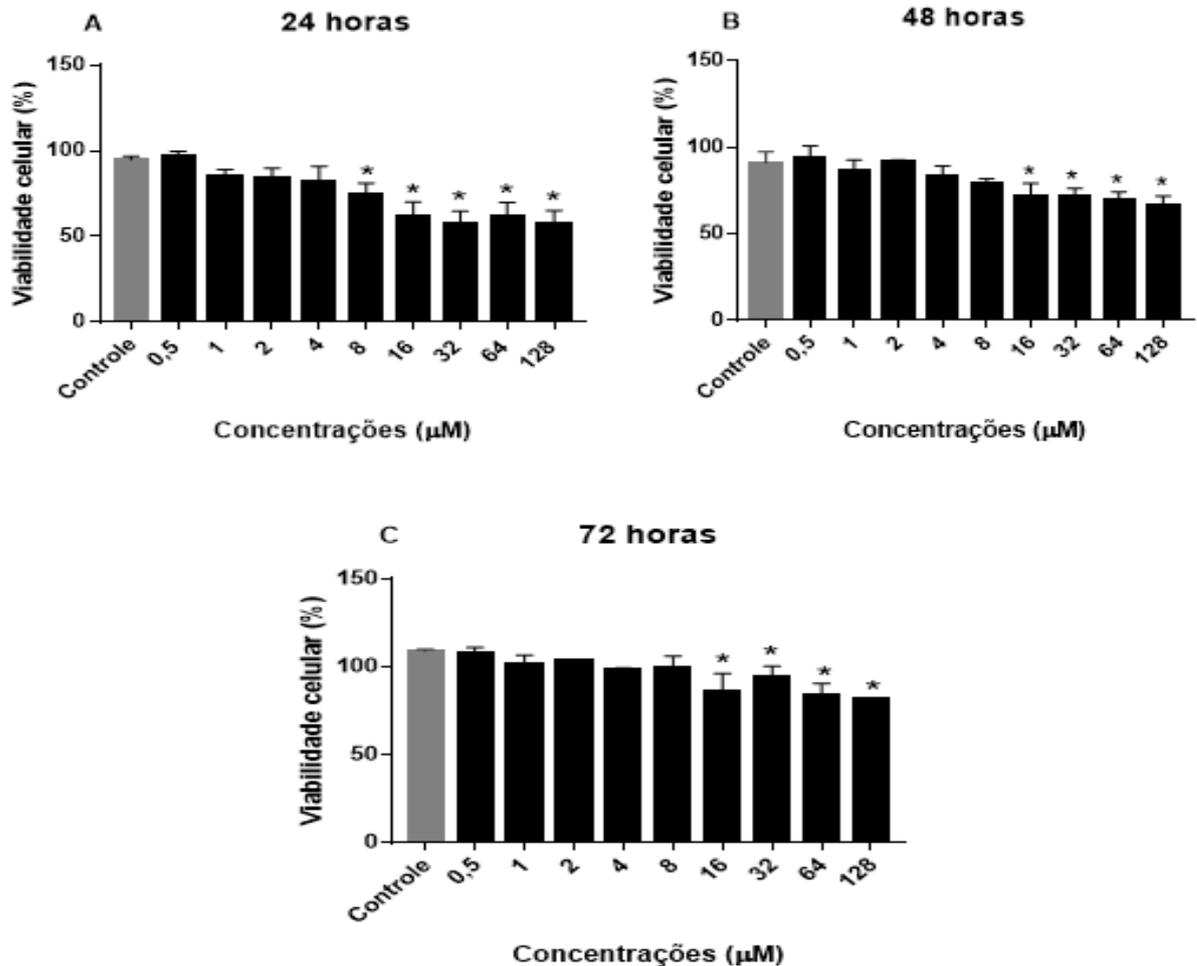
As análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico GraphPad Prism (versão 7.00 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de distribuição normal. Havendo os dados distribuição normal, utilizou a análise de variância sendo ANOVA de uma via e de duas vias. Posteriormente, os dados foram avaliados utilizando o pós-teste de Tukey. Os dados foram apresentados como sendo média  $\pm$  erro padrão da média, tendo o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ )

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO NA VIABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y NAS CONCENTRAÇÕES DE $Sb_2O_3$ NA POR 24, 48 E 72 HORAS.

Após as células SH-SY5Y serem submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de  $Sb_2O_3$  em meio DMEM contendo 10% de SFB, foi possível observar redução da viabilidade nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu M$  em 24 horas (Figura 3A). Em 48 horas (Figura 3B) e 72 horas (Figura 3C) a viabilidade celular diminuiu nas concentrações de 16, 32, 64 e 128  $\mu M$ .

Figura 3- Efeito de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y em 24, 48 e 72 horas de tratamento, meio suplementado com 10 % SFB

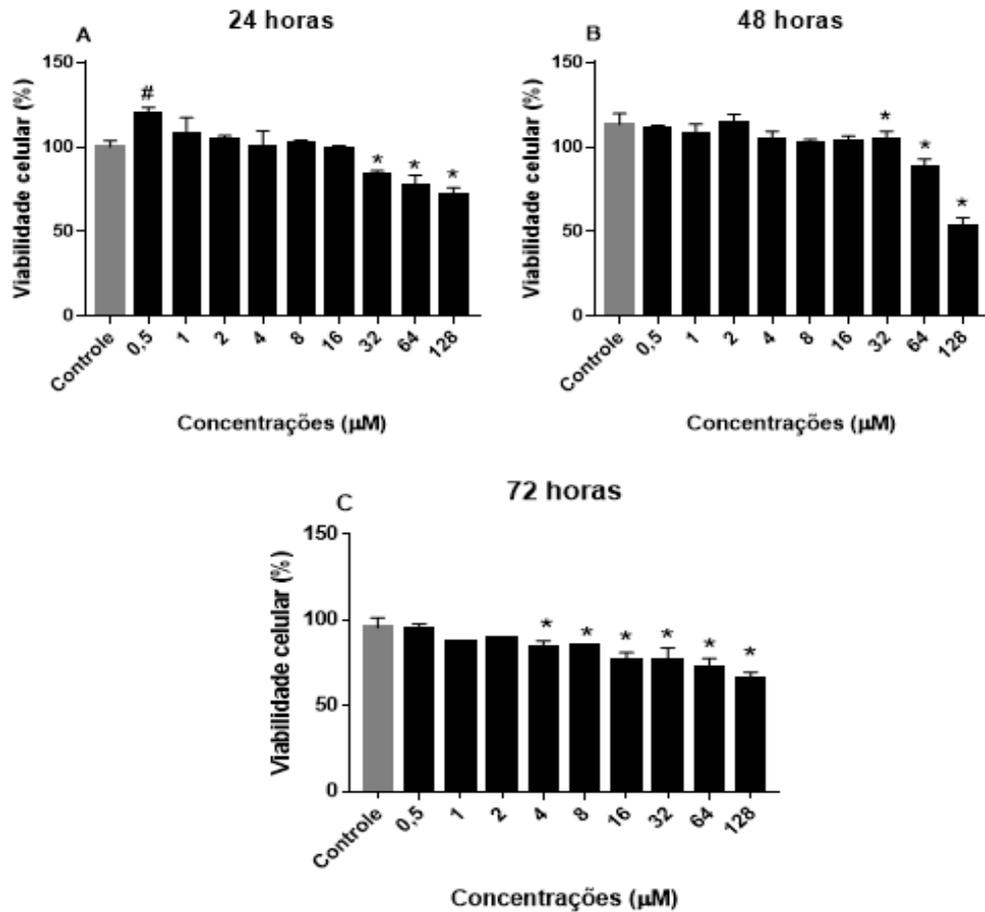


Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo método do MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. Cada símbolo (\*) representa a diminuição significativa da viabilidade de cada concentração em relação ao controle (células tratadas com o veículo da solução de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ). Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Quando o tratamento com o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foi realizado na ausência de SFB (Figura 4), foi possível verificar que houve redução na viabilidade celular em concentrações de 32, 64 e 128  $\mu\text{M}$  em 24 (4A) e 48 (4B) horas. Já no tempo de 72 (4C) horas, observou-se a perda na viabilidade celular nas concentrações de 4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{M}$ . Houve em 24 (4A) horas na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  um aumento na viabilidade celular de 20%, em comparação com o controle.

Figura 4- Efeito de  $Sb_2O_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y em 24, 48 e 72 horas de tratamento, em meio sem SFB



Fonte: O autor

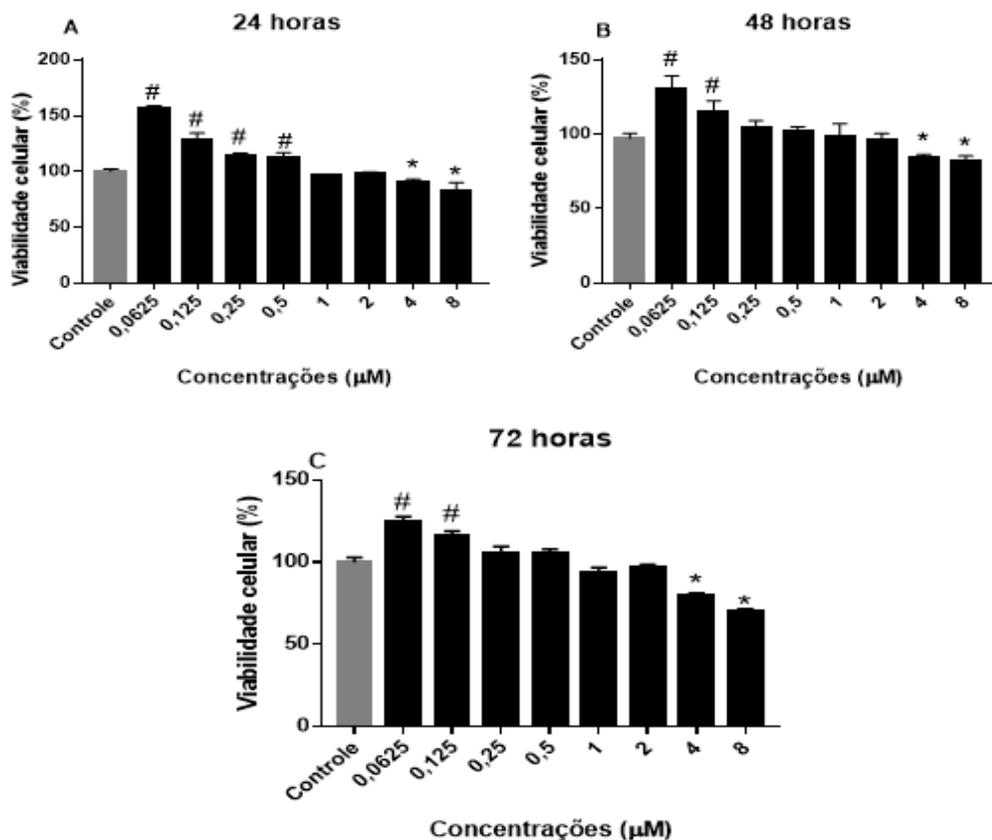
Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio de MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $Sb_2O_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. Cada símbolo (\*) representa a diminuição significativa na viabilidade em relação ao controle. O símbolo (#) mostra um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (células tratadas com o veículo da solução de  $Sb_2O_3$ ). Os valores foram obtidos por análise de ANOVA uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Como foi observado um aumento na viabilidade no tratamento de 0,5  $\mu M$  em meio DMEM sem soro no tempo de 24 h, concentrações abaixo de 0,5  $\mu M$  foram testadas. Sendo assim, experimento de viabilidade celular pelo método de MTT foi repetido usando as seguintes de concentrações de  $Sb_2O_3$ : 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8  $\mu M$ .

Quando os experimentos foram realizados com meio acrescido de 10% SFB, houve aumento da viabilidade celular nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5  $\mu M$ , após 24 h do tratamento como mostra a figura 5A. Nos 3 tempos (Figura 5

A, B e C), em 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  o aumento na viabilidade foi de, aproximadamente 30 %. No momento que as células foram tratadas com 4 e 8  $\mu\text{M}$ , observou-se uma diminuição na viabilidade.

Figura 5- Efeito de concentrações (8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y, em meio de cultivo suplementado com 10 % SFB



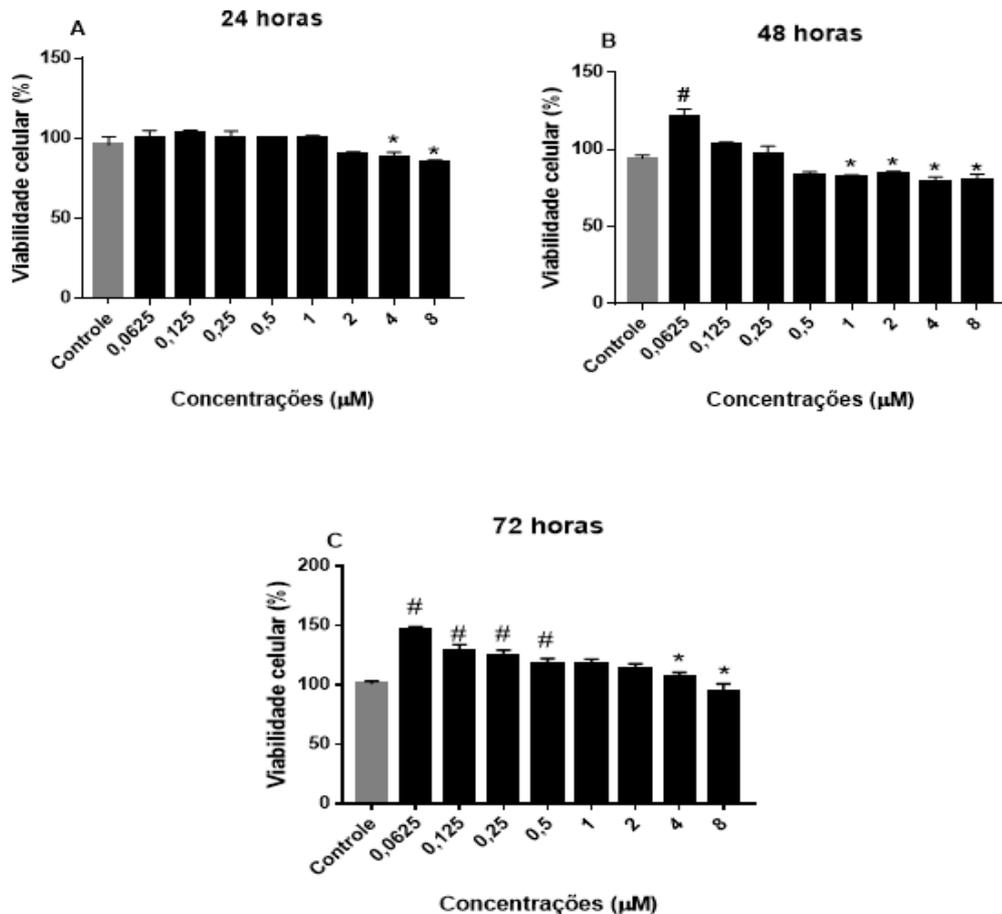
Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada pela técnica do MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. Cada símbolo (\*) representa a diminuição significativa na viabilidade em relação ao controle. O símbolo (#) mostra um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Células tratadas por 24 horas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio de cultivo sem SFB, apresentaram redução na viabilidade nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  por 24 horas (Figura 6A). Após 48 horas de tratamento a redução da viabilidade foi maior se comparado ao tempo de 24 h, sendo nas concentrações de 1, 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$  (Figura 6B). A exposição ao tratamento nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  por 72 horas reduziu a viabilidade (Figura 6C). O aumento na viabilidade celular foi observado nas

concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$  quando as células foram tratadas por 72 h e na concentração de 0,0625  $\mu\text{M}$  ao serem tratadas por 48 h.

Figura 6 - Efeito das concentrações 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y, em meio de cultivo sem SFB



Fonte: O autor

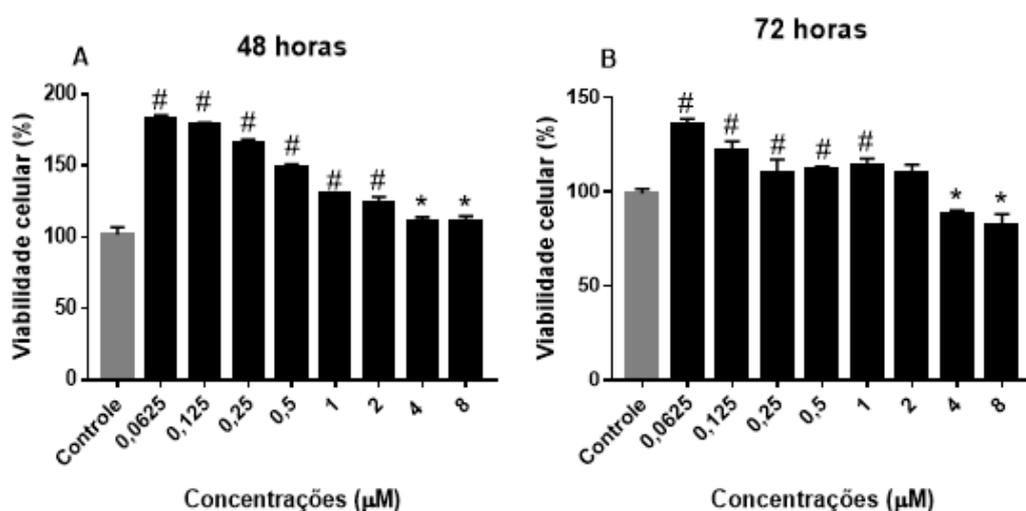
Nota: A viabilidade celular (%) avaliada pelo reagente MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. Cada símbolo (\*) representa a diminuição significativa na viabilidade em relação ao controle. O símbolo (#) mostra um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Os resultados mostrados nas figuras 3, 4, 5 e 6 demonstram que diferentes concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  podem causar diferentes efeitos na viabilidade das células SH-SY5Y. O  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induziu redução da viabilidade em concentrações igual e superiores a 1  $\mu\text{M}$ , e provocou a um aumento da viabilidade nas concentrações de 0,0625 a 0,5  $\mu\text{M}$ , sendo que este aumento na viabilidade pode ser indicativo de um efeito proliferativo.

Com a finalidade de verificar se a causa do aumento na viabilidade celular observado nas figuras 5 e 6 poderia ser decorrente de uma alteração no metabolismo mitocondrial, já que o reagente MTT é metabolizado na mitocôndria, procedeu-se com a realização de experimento de viabilidade utilizando o método de incorporação do vermelho neutro pela célula (VERMA et al., 2020; FRESHNEY, 2005). A técnica do vermelho neutro ocorre pela incorporação de eurodina, que tem carga neutra em pH fisiológico, é absorvida pelo lisossomo de células viáveis. Dentro do lisossomo, em contato com o pH lisossomal o vermelho neutro adquire a forma catiônica. Na sua forma catiônica, o vermelho neutro não consegue atravessar a membrana e acaba ficando preso dentro do lisossomo das células viáveis (ARHAMED; ALHADLAQ, 2014; BORENFREUND; PUERNER, 1985).

A Figura 7 e 8 mostram os resultados dos ensaios de viabilidade pela técnica do reagente vermelho neutro nos tempos de 48 e 72 horas. Houve aumento na viabilidade celular nos tratamentos de 0,0625 a 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio suplementado com 10% SFB após 48 horas de tratamento (Figura 7A) e nas concentrações de 0,0625 a 1  $\mu\text{M}$  por 72 horas (Figura 7B). Nos tratamentos de 4 e 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foi verificado uma redução na viabilidade, tanto em 48 quanto em 72 horas.

Figura 7- Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y pela técnica de vermelho de neutro tratadas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio suplementado com 10% SFB



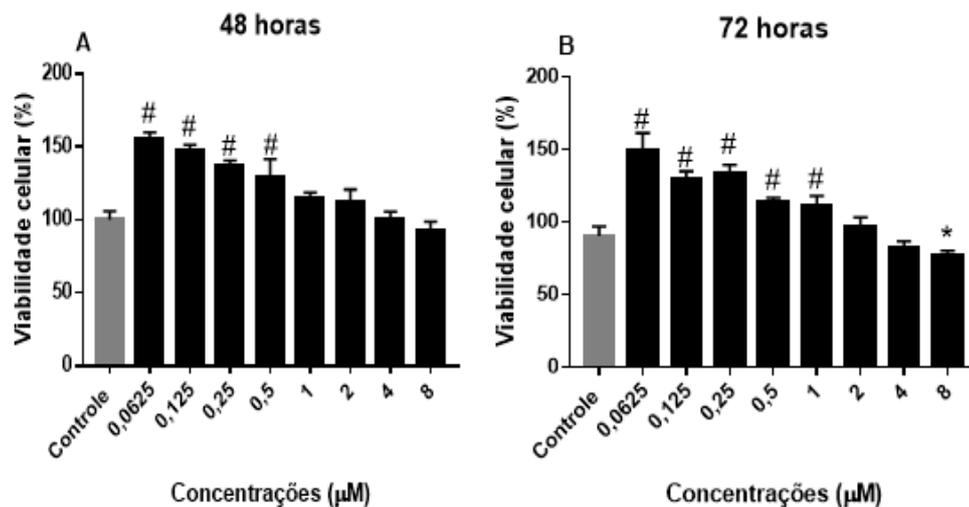
Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio colorimétrico do Vermelho Neutro nos tempos de (A) 48 horas e (B) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. O símbolo (#) representa as

diferenças estatísticas, apresentando aumento significativo na viabilidade celular com relação ao controle. O símbolo (\*) expressa uma diminuição significativa na viabilidade em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Este aumento na viabilidade celular também foi observado nos ensaios realizados em meio sem SFB (Figura 8). Já a diminuição na viabilidade foi observada apenas no tempo de 72 h e no tratamento com 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (Fig. 8B).

Figura 8 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y pela técnica de vermelho neutro tratadas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio sem SFB



Fonte: O autor

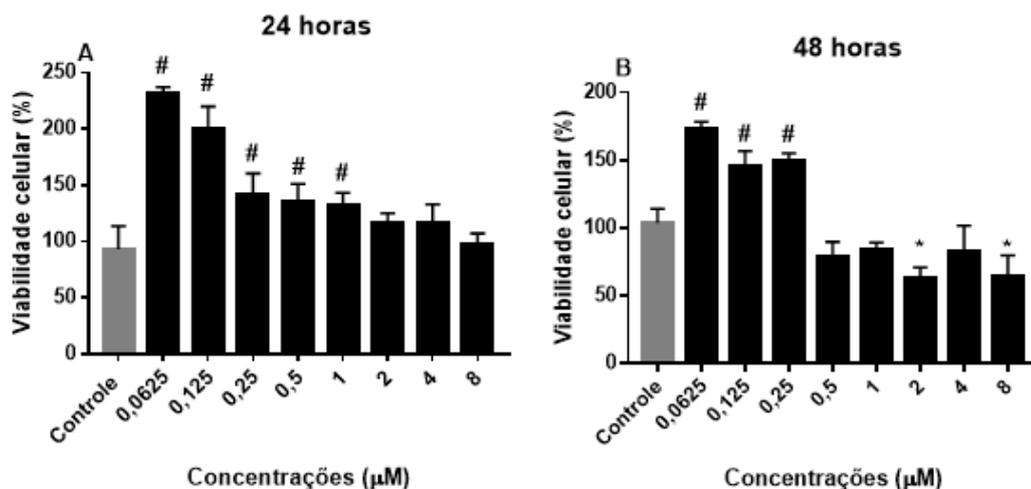
Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio com o corante Vermelho Neutro, sendo (A) 48 horas e (B) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. O símbolo (#) representa as diferenças estatísticas, apresentando aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle. O símbolo (\*) expressa diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Os resultados obtidos pela técnica de vermelho neutro corroboram com os resultados obtidos através do ensaio de viabilidade com o reagente MTT, ou seja, concentrações menores ou igual a 1  $\mu\text{M}$  levam a um aumento na viabilidade em células SH-SY5Y na presença ou não de SFB, podendo este aumento estar associado a proliferação celular induzida pela ação de baixas concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Para confirmar estes resultados obtidos pelas técnicas do MTT e vermelho neutro, foram realizados ensaios utilizando o corante fluorescente Sulforodamina B, corante este que perante condições ácidas se liga em aminoácidos de proteínas celulares (LIN et al., 1999; PAPAISIS et a., 1997). A figura 9 mostra que o aumento na viabilidade celular em concentrações de 0,0625 a 1  $\mu\text{M}$  em meio de cultivo suplementado com 10% de SFB, se repetiu. Sendo expressivo nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$ , em ambos tempos de exposição, 24 horas (A) e 48 horas (B). Já nas concentrações de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  por 48 horas (B) de exposição há uma redução na viabilidade celular.

Em meio de cultivo sem SFB (figura 10) o aumento na viabilidade celular ocorreu no tratamento de 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em 24 h (A), enquanto que em 48 h (B) o aumento se dá nos tratamentos de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Nestas condições, utilizando o método de SRB, não houve redução na viabilidade celular significativa.

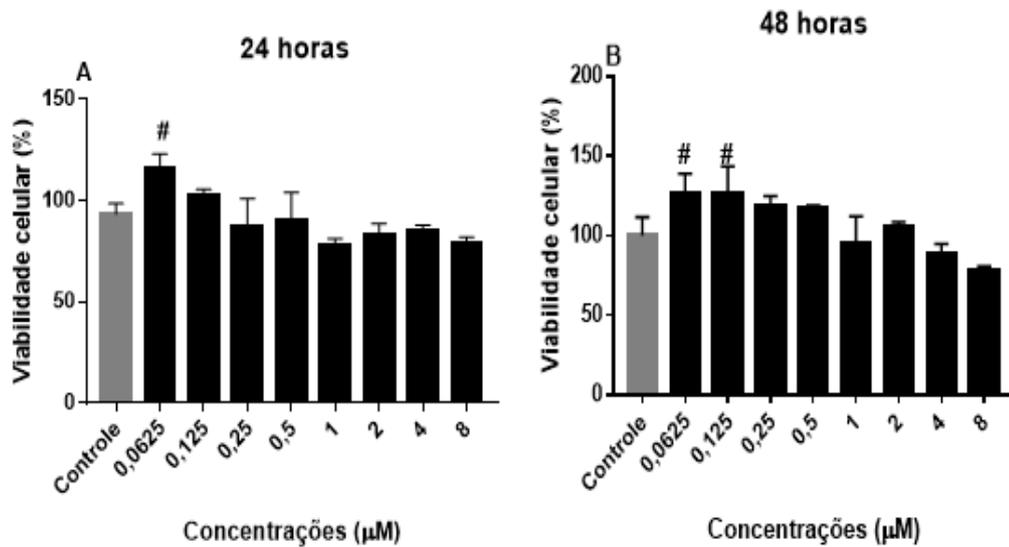
Figura 9 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y tratada com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em meio de cultivo com 10% SFB pela técnica colorimétrica pelo Sulforodamina B



Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através da técnica colorimétrica Sulforodamina B, sendo (A) 24 horas e (B) 48 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por dois ensaios independentes. O símbolo (#) representa aumento significativo na viabilidade celular em comparação com o controle. O símbolo (\*) expressa redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Figura 10 - Avaliação da viabilidade da linhagem SH-SY5Y tratada com  $Sb_2O_3$  com meio sem SFB pela técnica colorimétrica por Sulforodamina B



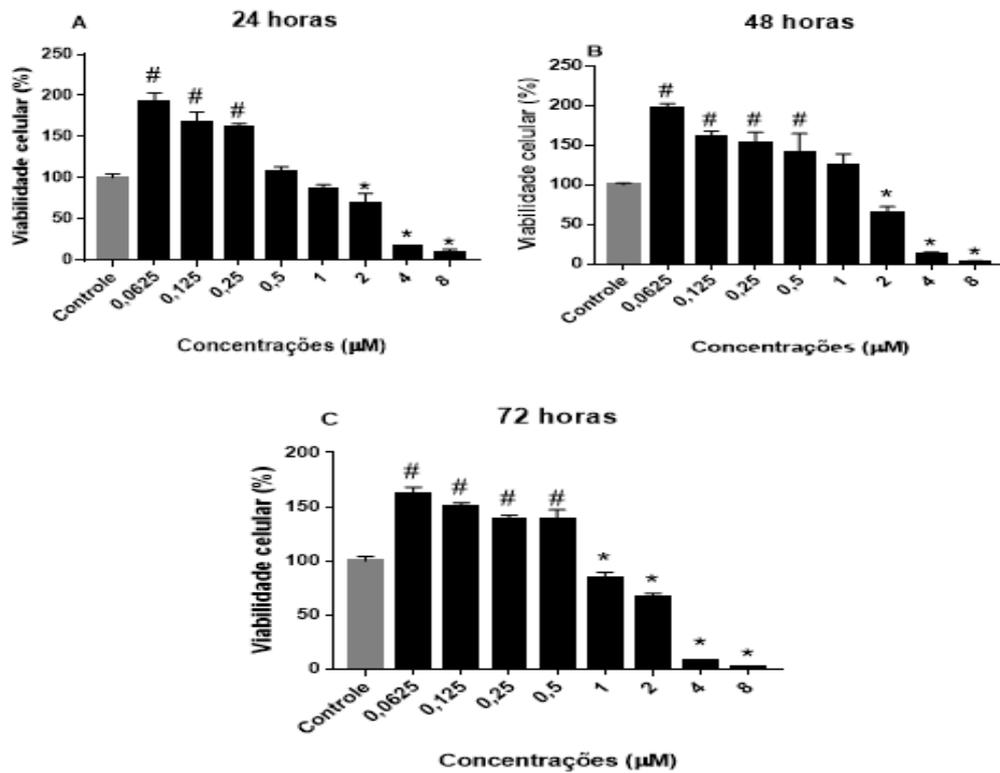
Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio colorimétrico Sulforodamina B, sendo (A) 24 horas e (B) 48 horas de exposição ao  $Sb_2O_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por dois ensaios independentes. O símbolo (#) representa aumento significativo na viabilidade celular em comparação com o controle. O símbolo (\*) expressa redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO $Sb_2O_3$ NA VIABILIDADE CELULAR LINHAGEM DE FIBROBLASTO MURINO (3T3) EM 24, 48 E 72 HORAS.

Com intuito de analisar se as alterações evidenciadas na viabilidade celular para o neuroblastoma SH-SY5Y é decorrente desta linhagem ser tumoral, ensaios de viabilidade usando a técnica do MTT foram realizados com a linhagem de fibroblasto murino 3T3. A linhagem 3T3 foi exposta as concentrações 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$ , na presença de 10% SFB (Figura 11) e em ausência de SFB (Figura 12) por tempo de (A)24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas.

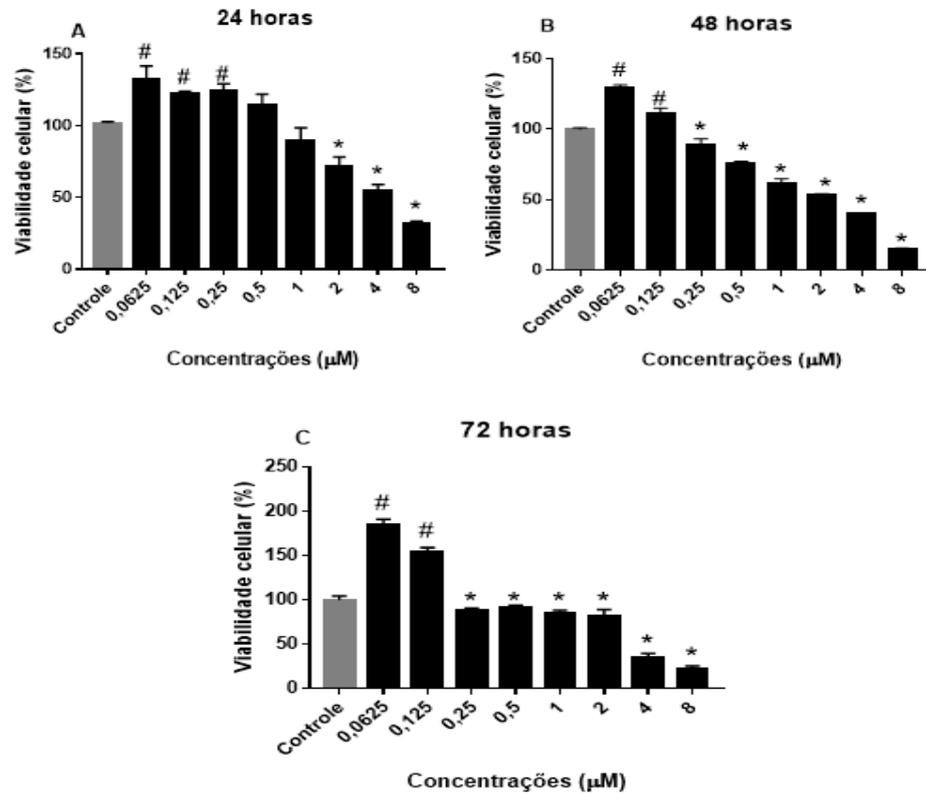
Figura 11 - Efeito do tratamento de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade da linhagem 3T3 em meio de cultivo suplementado com 10 % SFB



Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio com o reagente MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. O símbolo (#) representa aumento significativo na viabilidade celular em comparação com o controle. O símbolo (\*) expressa redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

Figura 12 - Efeito do tratamento de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade da linhagem 3T3 em meio de cultivo sem SFB



Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio com o reagente MTT, sendo (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. O símbolo (#) representa aumento significativo na viabilidade celular em comparação com o controle. O símbolo (\*) expressa redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle. Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de uma via, seguida pelo pós teste de Tukey.

A linhagem 3T3 mostrou ser sensível ao tratamento do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , apresentando uma redução na viabilidade no tratamento com 10% SFB (Figura 11). Sendo em concentrações de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  por 24h (A) e 48h (B) horas, enquanto que por 72 h (C) a redução ocorre em concentrações de 1 a 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Ainda, pode-se analisar que há um aumento da viabilidade nas concentrações de 0,0625 a 0,25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em 24 h (A), e este aumento continuou nos tempos de 48 h (B) e 72h (C) porém em concentrações de 0,0625 a 0,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Quando em tratamento sem SFB (Figura 12), a redução na viabilidade em tempo de 24 h (A) ocorre nas concentrações de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Em 48h (B) e 72 (C) h a redução da viabilidade acontece nas concentrações de 0,25 a 8  $\mu\text{M}$  de

$\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Já o aumento na viabilidade ocorre em concentrações de 0,0625 a 0,25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em 24h (A), enquanto que em tempo de 48h (B) e 72h (C) este aumento acontece apenas nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . A redução na viabilidade, como mostra as figuras 11 e 12, apresentou-se maior que a observada na linhagem SH-SY5Y. Esta redução na viabilidade do fibroblasto (3T3) ocorreu nos 3 tempos de exposição, quanto maior a dose do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  maior é a redução observada na viabilidade.

### 5.3 AÇÃO DO ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE OS EFEITOS NA VIABILIDADE CELULAR CAUSADOS PELO TRATAMENTO DE $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Estudos descritos anteriormente, comprovam que o Sb está diretamente relacionado com o aumento na produção de ROS e o estresse oxidativo, levando a uma perda na viabilidade além de induzir a morte celular (JIANG et al., 2021; LECUREUR et al., 2002; LÖSLER et al., 2006; VERDUGO et al., 2016; ZHONG et al., 2021). Assim, o estresse oxidativo que é gerado pelo aumento nos níveis celulares de ROS, apresenta-se como o principal responsável pela citotoxicidade deste metaloide (SU et al., 2022; TIMERNSTEIN et al., 1995).

Tendo conhecimento disto, com intuito de verificar se tanto o aumento quanto redução na viabilidade celular causado pelo tratamento de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  poderia ser revertido ao adicionar um reagente com função antioxidante, utilizou-se 10 mM de N-acetilcisteína (NAC) diluído nos meios de cultivo (meio contendo 10% e meio sem SFB) para tratamento prévio à adição nos tratamentos com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

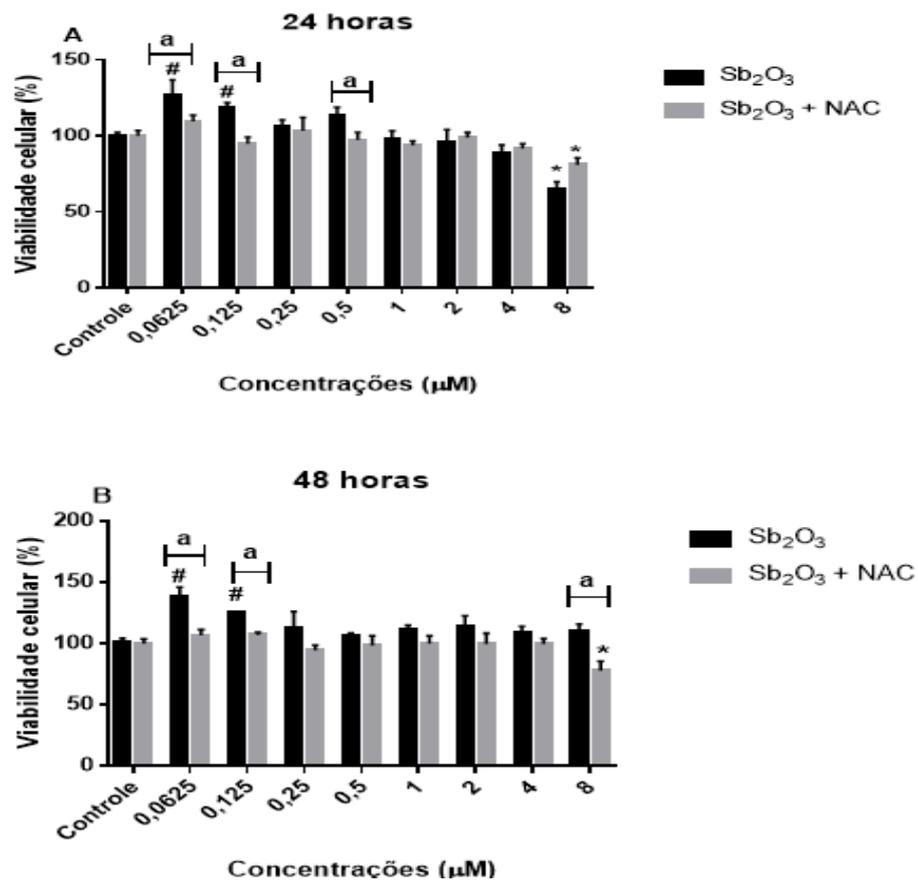
Os resultados usando o agente antioxidante NAC estão representados nas figuras 13 (condição de tratamento em meio de 10% SFB) e figura 14 (condição de tratamento em meio sem SFB) durante 24 e 48 horas. Quando as células foram tratadas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  por 24 horas na ausência de NAC (Figura 13 A), houve um aumento entre 20 e 30% na viabilidade, em comparação com o controle, nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$ . Porém, quando na presença de NAC, não ocorre esse aumento na viabilidade nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , sendo a viabilidade observada semelhante ao controle.

Nas concentrações de 0,0625; 0,125 e 0,5  $\mu\text{M}$  no tratamento por 24 horas (Figura 13 A), ao comparar-se a viabilidade das células tratadas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e com o

tratamento associado ao NAC, existe uma diferença entre eles. Na presença de NAC a viabilidade teve uma redução, comparando se ao controle, enquanto apenas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  esta viabilidade apresenta um aumento. Durante 48 horas (Figura 13 B) estes efeitos se repetiram nas mesmas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$ .

No tratamento por 24h com 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  há uma queda na viabilidade, em comparação ao controle, tanto na ausência quanto na presença de NAC (Figura 13 A). Já em 48 horas (Figura 13 B), na concentração de 8  $\mu\text{M}$  observa-se esta redução na viabilidade apenas em presença de NAC.

Figura 13 - Ação do N-acetilcisteína (NAC) sobre o efeito do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y durante 24 e 48 horas com o tratamento em meio de cultivo com 10 % SFB



Fonte: O autor

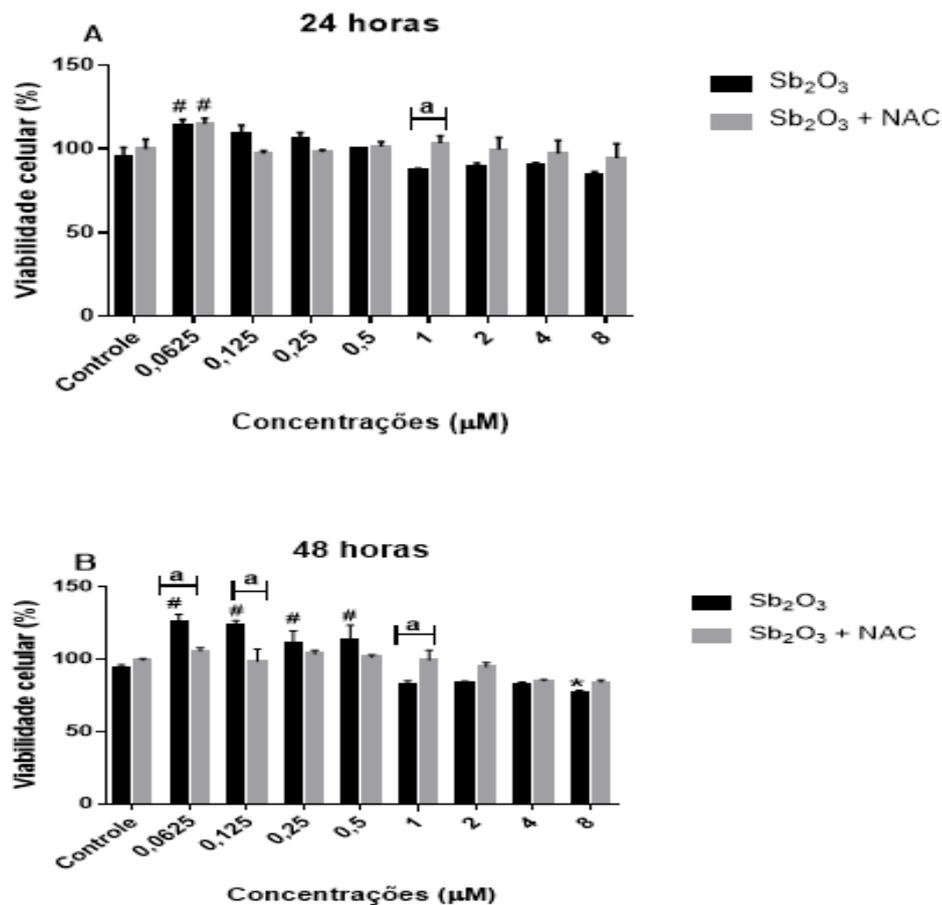
Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio com o reagente MTT, sendo (A) 24 horas e (B) 48 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por dois ensaios independentes. O símbolo (#) representa as diferenças estatísticas em comparação ao controle na sem NAC, apresentando aumento significativo na viabilidade celular. Em comparação aos pares, o símbolo (a) apresenta diferenças estatísticas entre as concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em presença e ausência de NAC. Já o símbolo (\*) expressa redução significativa na viabilidade celular em comparação com o controle em ausência de NAC. É possível verificar que no

tratamento contendo 10mM de N-acetilcisteína houve uma redução nos efeitos causados pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey.

Quando os tratamentos com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foram realizados em meio de cultivo sem SFB por 24 horas (Figura 14 A), na concentração de 0,0625  $\mu\text{M}$  observa-se um aumento na viabilidade, em relação ao controle, independente ou não da presença de NAC. Em 1  $\mu\text{M}$ , comparando por pares o tratamento apenas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e o na presença de NAC, há uma redução na viabilidade no tratamento sem NAC. Quando na presença de NAC, a viabilidade aproxima-se ao controle.

Após 48 horas (Figura 14 B) observa-se um aumento na viabilidade nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  apenas quando as células foram expostas ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , enquanto na presença de NAC este aumento não ocorre. Comparando as concentrações entre tratamento apenas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e em presença de NAC, há uma diferença entre ambos nas concentrações de 0,0625; 0,0125 e 1  $\mu\text{M}$ . Na presença de NAC, a viabilidade se aproxima ao controle, enquanto somente com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  tem-se um aumento na viabilidade. Podendo assim o NAC estar revertendo o aumento na viabilidade induzida pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . A concentração de 8  $\mu\text{M}$  em 48 horas (Figura 14 B) teve uma redução na viabilidade celular em tratamento apenas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Figura 14 - Ação do N-acetilcisteína (NAC) sobre o efeito do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y durante tempo de 24 e 48 horas com o tratamento, em meio de cultivo sem SFB



Fonte: O autor

Nota: A viabilidade celular (%) avaliada através do ensaio com o reagente MTT, sendo (A) 24 horas e (B) 48 horas de exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por dois ensaios independentes. O símbolo (#) representa aumento na viabilidade celular em comparação ao controle na ausência de NAC. Comparação por pares é representada pelo símbolo (a), onde há diferenças estatísticas entre as concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na presença e na ausência de NAC. Já o símbolo (\*) expressa uma redução na viabilidade celular. É possível verificar que no tratamento contendo 10mM de N-acetilcisteína houve uma redução nos efeitos causados pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey.

Como observado nas figuras 13 e 14, houve uma reversão no aumento de viabilidade celular causada pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , principalmente nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  quando em presença do antioxidante NAC. Visto que no tratamento apenas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  ocorre aumento da viabilidade celular nestas concentrações, comparando com o controle.

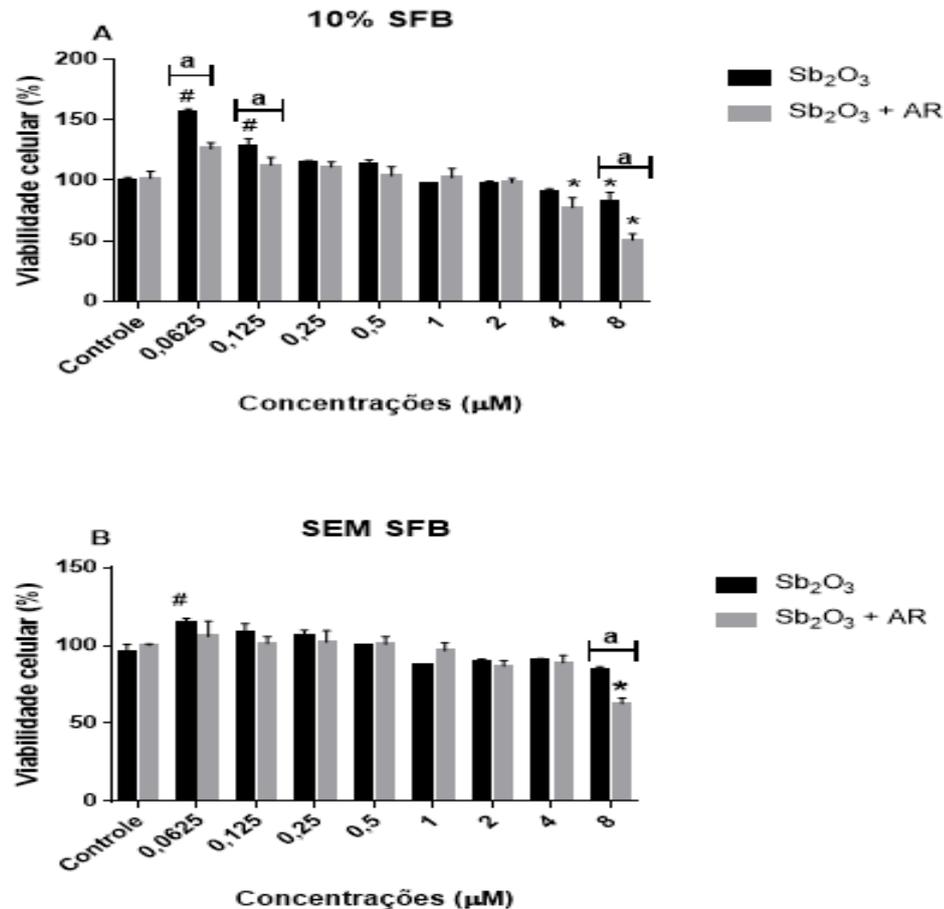
#### 5.4 EFEITO DO $Sb_2O_3$ NAS CELULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS COM ÁCIDO RETINÓICO EM COMPARAÇÃO COM CÉLULAS NÃO DIFERENCIADAS.

Considerando os resultados apresentados anteriormente observou-se que o composto aumentou a viabilidade celular das linhagens SH-SY5Y e 3T3 na presença e ausência de SFB quando foram empregadas concentrações de 0,0625 a 0,5  $\mu M$ . Com o objetivo verificar se linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciada poderia apresentar viabilidade semelhante ou não as células não diferenciadas, ensaios de viabilidade foram realizados com células SH-SY5Y submetidas ao tratamento com ácido retinóico, substância já demonstrada induzir esta linhagem a apresentar características de células neuronais (LOPES et al., 2010; XIE et al., 2010).

Para este ensaio apenas o tratamento por 24 horas foi realizado tanto em meio de cultivo suplementado com 10 % SFB (Figura 15 A) quanto em meio sem SFB (Figura 15 B). Para induzir a diferenciação da linhagem fez-se uso de 10  $\mu M$  de ácido retinóico durante 24 horas e após utilizou-se as concentrações de 0,0625 a 8  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$ . Células SH-SY5Y não diferenciadas na presença de 10% SFB (Figura 15 A) e tratadas com concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$ , apresentam aumento de 30 e 55% na viabilidade em relação ao controle, enquanto na concentração de 8  $\mu M$  apresentam uma redução na viabilidade. Este aumento na viabilidade de células não diferenciadas se repetiu na concentração de 0,0625  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$  na ausência de SFB (Figura 15 B), aumento de 20 % em comparação ao controle.

Ao comparar a viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas e não diferenciadas nas concentrações de 0,0625 e 0,125  $\mu M$  e na presença de 10% SFB (Figura 15 A), observa-se uma semelhança da viabilidade das diferenciadas com o controle. Em contrapartida, as células não diferenciadas apresentam aumento na viabilidade celular. Células SH-SY5Y diferenciadas, tiveram uma redução na viabilidade em concentrações de 4 e 8  $\mu M$  quando em presença de 10% SFB (Figura 15 A). Quando em meio sem SFB (Figura 15 B), a redução na viabilidade ocorre apenas em 8  $\mu M$ , comparando com o controle.

Figura 15 - Efeito de  $Sb_2O_3$  na viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e não diferenciadas



Fonte: O autor

Nota: Comparativo da viabilidade celular (%) de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e não diferenciadas, avaliada através do ensaio com o reagente MTT, em meio de cultivo suplementado com 10% SFB (A) e sem SFB (B) por tempo de 24 horas em exposição ao  $Sb_2O_3$ . As barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média, sendo obtidos por três ensaios independentes. O símbolo (#) representa as diferenças estatísticas, apresentando aumento na viabilidade celular nas células não diferenciadas. Já o símbolo (\*) expressa uma redução na viabilidade celular. A comparação por pares das concentrações de  $Sb_2O_3$  entre as células diferenciadas e não diferenciadas é representado pelo símbolo (a). Os valores foram obtidos por análise de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste pelo pós teste de Tukey.

O quadro abaixo apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios realizados. Observa-se que há uma redução na viabilidade celular em concentrações acima de 2  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$ . Contudo, quando as células são tratadas com concentrações menores que 1  $\mu M$  há um aumento na viabilidade celular independente da presença ou ausência de SFB no meio de cultivo. Pode-se verificar

que, ao utilizar um composto antioxidante (NAC) esses efeitos na viabilidade celular são revertidos, sendo semelhante ao controle.

Quadro 1 - Resumo dos resultados obtidos através de ensaios com os tratamentos de  $Sb_2O_3$ .

| Linhagem Celular | Tratamento                    | SFB      | Viabilidade Celular    | Concentrações          | Método de Análise |
|------------------|-------------------------------|----------|------------------------|------------------------|-------------------|
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Redução                | 4 a 128 $\mu M$        | MTT               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Redução                | 4 a 128 $\mu M$        | MTT               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Aumento                | 0,0625 a 0,5 $\mu M$   | MTT               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Aumento                | 0,0625 a 0,25 $\mu M$  | MTT               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Aumento                | 0,0625 a 2 $\mu M$     | V. N.             |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Aumento                | 0,0625 a 1 $\mu M$     | V. N.             |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Aumento                | 0,0625 a 1 $\mu M$     | SRB               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Redução                | 2 a 8 $\mu M$          | SRB               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Aumento                | 0,0625 a 0,125 $\mu M$ | SRB               |
| SH-SY5Y          | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Redução                | Não houve              | SRB               |
| 3T3              | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Redução                | 1 a 8 $\mu M$          | MTT               |
| 3T3              | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Redução                | 0,25 a 8 $\mu M$       | MTT               |
| 3T3              | Apenas $Sb_2O_3$              | Presença | Aumento                | 0,0625 a 0,5 $\mu M$   | MTT               |
| 3T3              | Apenas $Sb_2O_3$              | Ausência | Aumento                | 0,0625 e 0,125 $\mu M$ | MTT               |
| SH-SY5Y          | Cel. Diferenciada + $Sb_2O_3$ | Presença | Semelhante ao Controle | Todas                  | MTT               |
| SH-SY5Y          | Cel. Diferenciada + $Sb_2O_3$ | Ausência | Semelhante ao Controle | Todas                  | MTT               |
| SH-SY5Y          | $Sb_2O_3$ + NAC               | Presença | Semelhante ao Controle | Todas                  | MTT               |
| SH-SY5Y          | $Sb_2O_3$ + NAC               | Ausência | Semelhante ao Controle | Todas                  | MTT               |

Fonte: O autor

Nota: Quadro comparativo com resultados dos ensaios com células SH-SY5Y e 3T3. Estes resultados foram obtidos através dos ensaios de Viabilidade Celular (%) pelas técnicas de MTT, coloração por Vermelho Neutro (V.N.) e Suflorodamina B (SRB). Os ensaios foram realizados com meio DMEN com presença de 10 % soro fetal bovino (SFB) e na ausência dele. Observa-se que em concentrações acima de 2  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$  há uma redução na viabilidade celular de ambas linhagens (SH-SY5Y e 3T3). Já em concentrações abaixo de 1  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$  ocorre um aumento na viabilidade celular.

## 6 DISCUSSÃO

O Antimônio, metaloide amplamente utilizado pela indústria, é responsável por induzir efeitos tóxicos em diferentes organismos. Bactérias e fungos presentes em solos contaminados por antimônio, apresentam uma modificação na sua

estrutura morfológica. Vegetações em solos com antimônio indicam haver deficiência nos níveis de nutrientes devido a mudança no pH do solo, podendo ainda através das mesmas poluir toda uma cadeia ecológica. Fazendo este metaloide ter efeito tóxico ao ecossistema (ANDERSON, 2012; LIN et al.; WANG et al., 2021).

Nosso grupo de pesquisa observou que há linhagens celulares, como a SH-SY5Y que são mais resistentes aos efeitos do Sb, enquanto outras linhagens como a exemplo célula de adenocarcinoma humano (HeLa) são mais sensíveis a morte induzida pelo composto (SILVA, 2020).

Estudos demonstraram o efeito citotóxico do Sb em diferentes tipos celulares, tais como linhagens de fibroblasto, embrionárias, pulmonares (BOREIKO et al., 2021; JIANG et al., 2021; SIGH et al., 2016; WAN; WU et al., 2021) mas em linhagens neuronais pouco se sabe sobre estes possíveis efeitos. Como ainda não há muitos estudos no que diz respeito a toxicidade do antimônio em neurônios, nesse trabalho usamos como modelo de estudo a linhagem celular SH-SY5Y. A célula SH-SY5Y por ser uma linhagem de neuroblastoma humano, expressa proteínas neuronais específicas de humanos e suas isoformas, característica esta que faz com que essa linhagem seja muito usada como modelo de estudo (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983). O ideal seria usar neurônios que podem ser provenientes de culturas primárias de roedores ou de células progenitoras neurais humanas (hNPC), mas exigem reagentes de alto custo (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; LOPES et al., 2010; XIE et al., 2010). As células da linhagem SH-SY5Y já são utilizadas como modelo para estudos *in vitro* de patologias associadas ao sistema nervoso (XIE et al., 2010). Assim, selecionamos a linhagem SH-SY5Y para analisar os efeitos do  $Sb_2O_3$ .

A linhagem SH-SY5Y apresentou redução na viabilidade celular em concentrações, iguais ou maiores que 8  $\mu M$  de  $Sb_2O_3$  (Figura 3 e 4) tanto na presença quanto na ausência de SFB. Nossos dados obtidos são semelhantes aos encontrados na literatura que analisam diferentes linhagens tumorais após exposição ao Sb, como feocromocitoma de rato (PC12), células de adenocarcinoma de pulmonar humano (A549), neuroblastoma murino (Neuro-2a) e adenocarcinoma humano (HeLa) (JIANG et al., 2016; SILVA, 2020; ZHAO et al., 2017; ZHI et al., 2020).

Em células HeLa, Mann et al. (2006) relatam haver indução a morte celular quando tratadas com  $Sb_2O_3$  em concentrações entre 5 a 10  $\mu M$  durante 72 horas de

exposição. Wang et al. (2019) e Zhi e colaboradores (2020) mostraram em seus estudos com células PC12, que em concentrações superiores de 25 e 75  $\mu\text{M}$  de Sb por 24 horas de exposição ao Sb há uma redução na viabilidade nesta linhagem. Enquanto que Su e colaboradores (2022) ao investigarem a viabilidade de células A549 quando expostas ao cloreto de antimônio por 24 horas, verificaram que há redução na viabilidade em concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$ . Nota-se que a exposição, em concentrações acima de 5  $\mu\text{M}$  de antimônio, a diferentes tipos celulares tumorais, não apenas em SH-SY5Y, leva a efeitos citotóxicos principalmente a redução da viabilidade e morte celular. Nosso grupo de pesquisa ao analisar células PC12, Neuro2a, SH-SY5Y e HeLa expostas a concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  verificaram que linhagens como PC12, SH-SY5Y e Neuro-2a somente apresentaram redução da viabilidade na maior concentração utilizada, 128  $\mu\text{M}$ . Em comparação com as linhagens não tumorais que mostraram ser mais sensíveis ao Sb. Para verificar ainda o tipo de morte celular que concentração de até 32  $\mu\text{M}$  de Sb causou nas linhagens, usou as linhagens SH-SY5Y e HeLa. Nosso grupo demonstrou que há indícios de morte celular por apoptose nestas linhagens testadas (SILVA, 2020).

Pode se verificar ainda que em nossos resultados o antimônio levou a um aumento na viabilidade em concentrações iguais ou inferiores a 2  $\mu\text{M}$ , dependendo do tempo de exposição (Figura 5 e 6). No estudo de Zhang et al. (2018) ao estudar células de adenocarcinoma prostático (PC-3) e carcinoma metastático de próstata humano (LNCaP) expostas a concentrações de 10, 0,5 e 0,4  $\mu\text{M}$  de tartarato de antimônio, demonstraram haver uma indução à proliferação celular, além de um crescimento aumentado nestas células. A proliferação celular induzida por antimônio também foi demonstrada pelo estudo de Lou e colaboradores (2021) ao usarem linhagem de câncer de bexiga, células (EJ), expostas a concentrações inferiores a 4  $\mu\text{M}$  de antimônio. Em 0,8  $\mu\text{M}$  os autores evidenciaram que este metaloide promove a proliferação celular, além de um aumento na atividade migratória. Demonstrando que baixas concentrações de antimônio estão intimamente ligadas com a progressão e proliferação celular do câncer de bexiga cultivado *in vitro*.

Os nossos resultados de aumento de viabilidade da linhagem SH-SY5Y obtidos quando as células foram expostas a concentrações menores que 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foram confirmados a partir de três técnicas distintas de determinação de

viabilidade celular, demonstrados por: MTT (Figura 5 e 6), Vermelho Neutro (Figura 7 e 8) e Sulforodamina B (Figura 9 e 10).

A técnica de análise de citotoxicidade por MTT possibilita a mensuração da viabilidade de células metabolicamente ativas através da redução de tetrazólio pelo dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH) em cristais de formazan que apresentam violácea, isto em células viáveis metabolicamente ativas (VERMA et al., 2020; FRESHNEY, 2005). Já o vermelho neutro é um reagente incorporado pelos lisossomos das células vivas, quando as linhagens celulares entram em apoptose, não ocorre absorção deste corante e conseqüentemente a perda da viabilidade celular leva a redução na quantidade de vermelho neutro nas células (ARHAMED; ALHADLAQ, 2014; BORENFREUND; PUERNER, 1985). A técnica de coloração através do corante arroxeadado Sulforodamina B (SRB) ocorre quando o corante, em condições ácidas, liga se em aminoácidos de proteínas celulares. Esta ligação é estequiométrica, sendo a quantidade do corante que é extraído pelas células pigmentadas correlacionado com número de células (LIN et al., 1999; PAPAISIS et al., 1997; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Desta maneira após verificar aumento de viabilidade da linhagem SH-SY5Y por três técnicas distintas, podemos inferir que este aumento está relacionado com a proliferação induzida pelo Sb. Zhang et al. (2018) em seus trabalhos demonstraram que baixas doses de Sb, inferiores a 1,2  $\mu\text{M}$ , promove proliferação celular em linhagem de câncer de próstata, podendo ainda provocar o crescimento do tumor imitando a atividade androgênica nas células de câncer de próstata que são dependentes de androgênio. Outro mecanismo de citotoxicidade do Sb apresentado por Zhang et al. (2018) em seu outro trabalho é que o metaloide pode aumentar a estabilidade da proteína c-Myc, proteína que desempenha papel crucial na regulação do ciclo celular; e alterações no gene que a codifica estão relacionadas a manutenção e ao progresso tumoral. Podem ainda induzir a proliferação celular nestas células, porém através da ativação da via de sinalização CtBP2-ROCK1.

Para verificar se o antimônio poderia ter os mesmos efeitos em linhagens não tumorais, usou-se a célula fibroblasto 3T3. As concentrações usadas foram 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . O aumento na viabilidade celular observado em células SH-SY5Y se repetiu na linhagem 3T3 nas concentrações de 0,0625 a 0,25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em ambos os tratamentos, na presença e ausência de SFB (Figura 11 e 12). Em relação a redução, o fibroblasto 3T3 apresentou uma

redução na viabilidade em concentração de 0,25 a 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , demonstrando ser mais sensível ao tratamento com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  quando comparado com células SH-SY5Y. Chen et al. (2010) também utilizaram a linhagem 3T3 para investigar qual seria os efeitos do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Os autores descrevem haver uma redução expressiva na viabilidade em concentrações inferiores a 12  $\mu\text{M}$ , além de elevada embriotoxicidade. Jiang e seus colaboradores (2016) ao utilizarem a linhagem embrionária de rim humano (HEK-293t), linhagem não tumoral, expostas ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  verificaram haver, acima de 35%, morte celular quando tratadas com 8 a 16  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Esta morte celular estava, principalmente, correlacionada com apoptose induzida pelo composto. Assim, os efeitos tóxicos do antimônio ocorrem em linhagem tumorais e não tumorais, sendo as não tumorais mais suscetíveis a este metalóide.

Em sua maioria, as condições relatadas em estudos citotóxicos com o Sb estão associadas ao Arsênio (As), cujas características físico-químicas se assemelham (ARAI, 2010; HERATH et al., 2017; TAMAS et al., 2014; WILSON et al., 2010). Com o arsênio, há estudos citotóxicos que utilizam linhagens neuronais, tumorais e não-tumorais onde demonstram os efeitos que este composto causa nestas células (CASTRO et al., 2011; MEDDA et al., 2021; SIGH et al., 2016; WAN et al., 2021). Estes efeitos são, principalmente, o aumento na produção de ROS, levando como consequência a redução no número de células viáveis, danos genotóxicos e a aumento nos níveis de processos apoptóticos (ALARIFI et al., 2013; CHAYAPONG et al., 2017; LU et al., 2013; YEDJOU; TCHOUNWO, 2007; ZHAO et al., 2018).

Assemelhando ao As, os principais fatores de resposta celular após exposição ao Sb, são as alterações metabólicas. Este metaloide modifica o metabolismo normal das células através de aumento na produção de ROS. O estresse oxidativo, causado pelo aumento de ROS, conduz as linhagens a processos anormais como: interrupção do ciclo celular, ou ainda a célula continuar o ciclo celular sem os reparos corretos que se fazem necessários para o êxito do processo de divisão celular (JIANG et al., 2016; SU et al., 2022; ZHONG et al., 2021). Este aumento acentuado do metabolismo energético causado pelo Sb acaba por desempenhar um papel importante na citotoxicidade em hepatócitos de camundongos, como demonstrado nos estudos de Valko (2006) e confirmado por Zhong (2021).

Já foi confirmado por Verbon et al. (2012) que ROS influenciam a presença, a atividade e a estrutura química de enzimas como ciclinas e cinases dependentes de ciclinas. Enzimas estas que controlam e regulam a progressão do ciclo celular. Através das ROS ocorre a fosforilação e ubiquitinação dessas CDK's e ativação de receptores do fator celular de crescimento. Estes fatores acabam por modificar a fisiologia celular normal de divisão causando morte celular ou divisão celular descontrolada, sem as corretas checagens.

O meio padrão para cultivo das linhagens tem adição de soro fetal bovino. Contudo, o soro fetal bovino em estudos *in vitro* é descrito como possível agente capaz de interferir na produção de ROS ao comparar com grupos de células que não recebem. Tendo ainda, um aumento em seu desenvolvimento e no número total de células no grupo com SFB (BISWAS; HYUN, 2021; GUO et al., 2019). A presença de SFB no meio de cultivo estimula um aumento do metabolismo lipídico intracelular (BISWAS; HYUN, 2021; GUO et al., 2019; KIM et al., 2019). Estudos complementares apontam vários transcritos antioxidantes positivamente regulados após suplementação do meio de cultivo com SFB (KIM et al., 2019; MUN et al., 2017). Uma vez descrito que o antimônio é um composto que induz a formação de radicais livres e através dos dados observados na figura 10, a avaliação na ausência de soro se justifica e se faz necessária nos ensaios realizados neste trabalho.

Em seus estudos Zhu et al. (1999), e posteriormente confirmado por Losler e colaboradores (2009), demonstraram ao estudar a citotoxicidade do As e Sb que ao utilizar BSO como antioxidante, a morte celular pós exposição ao As e ao Sb foram atenuados. Células expostas a estes metaloides apresentaram uma redução na sua viabilidade, e quando havia o tratamento com BSO a viabilidade aumentava comparando-se ao controle. Sendo assim, estes fatores de resposta celular pós exposição a estes metaloides poderiam ser revertidos pela utilização de antioxidantes, como descrito pelos autores (LOSLER et al., 2008; VALKO et al., 2006; ZHU et al., 1999; ZHONG et al., 2021).

Para verificar se as alterações na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y, apresentados em nosso estudo, estariam relacionadas ao aumento na produção de ROS, ensaios de viabilidade usando NAC foram realizados. Os resultados demonstraram que ao utilizar o antioxidante NAC no tratamento com as concentrações 8 a 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  em células SH-SY5Y (Figura 13 e 14) ocorre uma reversão nos efeitos causados pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  quando comparado com as células

tratadas apenas com o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , que apresentaram aumento na viabilidade em concentrações de 0,25 a 0,0625  $\mu\text{M}$ . Ou seja, no momento em que foi empregado o NAC no tratamento com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , nas concentrações de 0,25 a 0,0625  $\mu\text{M}$  não foi observado aumento na viabilidade, anulando o efeito causado pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Esta inibição do efeito causado pelo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na viabilidade celular no tratamento em presença de NAC quando comparado com apenas  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  é observado tanto em meio de cultivo contendo 10% SFB quanto sem SFB, não havendo diferença em ambas as condições do meio de cultivo.

Os dados utilizando o tratamento de Sb com o NAC, foram semelhantes aos obtidos por Deng e colaboradores (2019), que viram que a indução a proliferação celular em células troncos tumorais (U87) e linhagem de glioma humano (U251) ocasionados por ROS pós exposição ao Sb foi reduzida após o tratamento com antioxidante NAC. Estes dados são confirmados através dos obtidos por Su et al. (2022) que ao usar um tratamento com 5 mM de NAC em linhagens A549 observou que o NAC atenuou a perda de viabilidade que havia ocorrido pós exposição ao Sb. Ainda, o NAC previu a parada do ciclo celular na fase G2/M. Jiang et al. (2016) demonstraram também a capacidade do antioxidante NAC em inibir os efeitos causados pela exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ . Em seu estudo, ao expor células HEK-293 ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  observaram um aumento de 1,5 a 2 x nos níveis de caspases 3 e caspases 7, consequentemente um elevado aumento de células em apoptose. Estes efeitos foram inibidos quando células foram tratadas com o antioxidante NAC, tendo ainda um aumento na viabilidade. No caso de He e seus colaboradores (2021), ao utilizarem o tratamento com o NAC em células Oli-neu, linhagem de células precursoras de oligodentrócitos, expostas ao arsênio verificaram que o antioxidante NAC inibiu as alterações morfológicas e os efeitos na viabilidade que haviam sido causadas pelo As. Assim, uma solução antioxidante pode reverter os efeitos causados na viabilidade em células que são expostas ao Sb.

Estudos tem demonstrado que células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico tornam-se mais excitáveis e com um potencial de membrana aumentado, podendo expressar marcadores específicos neuronais como: noradrenalina, proteína associada ao crescimento (GAP-43), além de sinaptofisina e proteínas neuronais específicas do citoesqueleto (proteína Tau) (CHEUNG et al., 2009; GIMENEZ-CASSINA; LIM; DIAZ-NIDO, 2006). Com o Arsênio estudos mostram que este composto induz alterações no processo e até mesmo interrompe a diferenciação

celular (LIU; BAIN, 2014; SZYMKOWICZ; SIMS, 2019). Wisessaowapak et al. (2021) ao utilizar células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinoico expostas ao arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ) relata que o arsênio aumentou a fosforilação da proteína tau, proteína estabilizadora de microtubulos. Ainda há um aumento na atividade da enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) na membrana celular. Esta enzima age controlando e afetando diretamente no crescimento, morfologia, apoptose e mobilidade celular. A exposição prolongada ao  $\text{NaAsO}_2$  ainda leva a interferência direta na sinalização neuronal da insulina e reduz a fosforilação da proteína quinase B (Akt) nestas células diferenciadas (NIYOMCHAN et al., 2018; ULLAH et al., 2021).

Os nossos resultados aqui apresentados mostram que células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico não apresentam aumento na viabilidade ao serem expostas à  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , como acontece com células não diferenciadas. Nas concentrações 0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  as células diferenciadas com ácido retinóico apresentam viabilidade semelhante ao controle (células não tratadas com  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ). Já em 4 e 8  $\mu\text{M}$  a redução na viabilidade, observada na figura 15 se manteve independente se a célula esta diferenciada ou indiferenciada. Os resultados demonstram que células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico podem ser mais resistentes ao efeito de aumento na viabilidade induzida por pequenas concentrações (0,0625 e 0,125  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , mas ainda se mantem a redução na viabilidade em concentrações 4 e 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

Estes resultados corroboram aos encontrado por Bregoli e seus colaboradores (2009), ao estudar o efeito do antimônio em células CD34+ da medula óssea diferenciadas onde houve uma diminuição na taxa de proliferação celular nestas células diferenciadas após exposição ao metaloide. Por outro lado, Yu e colaboradores (2022) demonstram haver uma perda na viabilidade em célula neuronal, neurônios murinos, após exposição a concentrações superiores a 75  $\mu\text{M}$  de Sb. Estes neurônios quando tratados com estas concentrações de Sb apresentaram uma diminuição no tamanho do núcleo celular, apoptose devido aumento na fragmentação do material genético (DNA) e elevado aumento nos níveis celulares de ferro (Fe) livre.

Os protocolos de diferenciação precisam ser empregados para confirmar estes resultados observados, para que então possamos inferir se neurônios poderiam ser mais resistentes aos efeitos do Sb em comparação com a linhagem SH-SY5Y.

Mediante aos resultados apresentados neste estudo, pode se verificar que  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induz toxicidade na linhagem SH-SY5Y. Concentrações baixas de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  levam a um aumento na viabilidade, dados confirmados através de três técnicas distintas (MTT, vermelho neutro e sulforodamina B). Este aumento na viabilidade em baixas concentrações aponta a uma possível proliferação celular na linhagem neuronal SH-SY5Y ocasionada pelo antimônio, proliferação já descrita em estudos com células não neuronais (DENG, et al., 2019; LOU et al., 2021; SU et al., 2022; ZHANG et al., 2018).

Já concentrações superiores a 4  $\mu\text{M}$  acarretam redução na viabilidade da linhagem SH-SY5Y. Em comparação a linhagem SH-SY5Y, o fibroblasto 3T3 mostrou ser sensível ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , consolidando dados descritos por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (SILVA, 2020). Estes resultados ampliam a percepção referente os possíveis efeitos tóxicos que o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induz em células de neuroblastoma.

O uso de antioxidante (NAC) no estudo, revela que o aumento na viabilidade celular causados pós exposição ao  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  é revertido em presença de NAC apresentando ser uma estratégia promissora. O uso de substâncias com ação antioxidante pode tornar se uma possível alternativa contra os efeitos tóxicos que são causados por exposição ao antimônio.

Dados com relação a toxicidade do antimônio em células neuronais ainda são escassos. Ao diferenciar célula SH-SY5Y para que apresentasse características de neurônio e expor elas as concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , pode se concluir que: comparando com as células indiferenciadas, células SH-SY5Y diferenciadas tiveram sua viabilidade aproximada ao controle, podendo ser resistentes ao trióxido de antimônio. No entanto, mais estudos utilizando linhagem de neuroblastoma diferenciadas expostas ao antimônio necessitam ser realizados.

## 7 CONCLUSÕES

O  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  induziu toxicidade na linhagem SH-SY5Y e na linhagem 3T3.

A linhagem celular SH-SY5Y foi resistente aos efeitos das concentrações do  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  apresentando queda na viabilidade em concentrações de 4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{M}$ .

Nas concentrações de 1, 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  células de 3T3 já apresentavam diminuição na viabilidade.

A linhagem celular 3T3 mostrou ser mais sensível aos efeitos causados pelas concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

As linhagens SH-SY5Y e 3T3 apresentaram aumento expressivo na viabilidade celular em comparação com o controle, em concentrações de 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ .

O antioxidante NAC inibiu os efeitos causados pelas concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  na linhagem SH-SY5Y.

Células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico mostraram ser mais resistentes aos efeitos causados pelas concentrações de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  ao comparar com as que não foram diferenciadas.

## REFERÊNCIAS

- AL-GUBORY, K.H. Environmental pollutants and life style factors induce oxidative stress and poor prenatal development. **Reprod. Biomed.** v.29, n.17, 2014.
- ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S.; MASQSOOD, A.S.; BAHY, A.A. Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. **Onco Targets and Ther.**v.6, p. 75–84, 2013.
- ANDERSON, C. The metallurgy of antimony. **Geochemistry.** v.72, n.4, p.3-8, 2012.
- ARAI, Y. Arsenic and Antimony. **Trace Elem. Soil J.** 383. 2010.
- ARHAMED, M.; ALHADLAQ, H. A. Nickel nanoparticle-induced dose-dependent cyto-genotoxicity in human breast carcinoma cells MCF-7 CELLS. **J. Oncotargets and therapy.**v.7, p. 269-280, 2014.
- ATCC. American Type Culture Collection. Disponível em: <https://www.atcc.org>. Acesso em Set. 2021.
- BAILEY, K.A.; SMITH, A.H.; TOKAR, E.J.; GRAZIANO, J.H.; KYOUNG-WOONG, K.; NAVASUMRIT, P.; RUCHIRAWAT, M.; THIANANAWAT, A.; SURK, W.A.; FRY, R.C. Mechanisms underlying latent disease risk associated with early-life arsenic exposure: current research trends and scientific gaps. **Environment Health Perspect.** 2016.
- BELZILE, N.; CHEN, Y.-W; FILELLA, M. Human Exposure to Antimony: I. Sources and Intake. **Critical reviews in Environmental Science and Technology.** v.41, 2011.
- BERNARDINI, J.P.; LAZAROU, M.; DEWRSON, G. Parkin and mitophagy in cancer. **Oncogene.** v.10, p.1315-1327, 2017.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J Tissue Cult Methods.** v.9, n.1, p.7–9, 1985.
- BOREIKO, C.J.; HENDRICKS, G.; DERR, R.; HUPPERT, M.; ROSSMAN, T.G. Mode of action assessment of the genotoxic properties of antimony and its compounds evaluated in the ToxTracker assay. **Mutation Res. Genetic Toxicology Environment Mutagen.** v.65, n.8, p. 503-523, 2021.
- BISWAS, D.; HYUN, S.H. Supplementation of fetal bovine serum increased the quality of *in vitro* fertilized porcine embryo. **Journal Advanced of veterinary and Animal research.** v.8, n.4, p.589- 596, 2021.
- BREGOLI, L.; CHIARINI, F.; GAMBARELLI, A.; SIGHNOLFI, G.; GATTI, A.M.; SANTI, P.; MARTELLI, A.M.; COCCO, L. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles

on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines. **Toxicology**. v.262, n.2, p. 121-129, 2009.

CANEPARI, S., MARCONI, E., ASTOFI, M.L., PERRINO, C. Relevance of Sb (III), Sb (V), and Sb-containing nano-particles in urban atmospheric particulate matter. **Anal. Bioanal. Chemical**. v.397, p. 2533-2542, 2010.

CARLIN, J. Antimony. U.S. Geological Survey Mineral Commodity Summaries, 2000.

CASTRO, Y.C.; DEL RAZO, L.M.; HUERTA, M.; LOPEZ, A.; ORTEGA, A.; LÓPEZ, B.E. Arsenite exposure downregulates EAAT1/GLAST transporter expression. In glial cells. **Toxicology Science**. v.2, n.2, p. 539-550, 2011.

COOPER, R.G.; HARISSON, A.P. The exposure to and health effects of antimony. **Indian Journal Occupational Environmental Medicine**. v. 1, p. 3-13, 2009.

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**. Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

CHAYAPONG, J.; MADHYASTHA, H.; MADHYASTHA, R.; NURRAHMAH, Q. I.; NAKAJIMA, Y.; CHOIJOOKHUU, N.; HISHIKAWA, Y.; MARUYAMA, M. Arsenic trioxide induces ROS activity and DNA damage, leading to G0/G1 extension in skin fibroblasts through the ATM-ATR- associated Chk pathway. **Environ. Sci Pollut Res**. v.24, p.5316-5325, 2017.

CHEN, R.; CHEN, J.; CHENG, S.; QIN, J.; LI, W.; ZHANG, L.; JIAO, H.; YU, X.; ZHANG, X.; LAHN, B. T.; XIANG, A. P. Assessment of embryotoxicity of compounds in cosmetics by the embryonic stem cell test. **Toxicology Mechanisms And Methods**. v. 20, n. 3, p. 112–118, 2010.

CHEUNG, Y. T.; LAU, W. K.; YU, M. S.; LAI, C. S.; YEUNG, S. C.; SO, K. F.; CHANG, R. C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity. **Research NeuroToxicology**. v.30, n.1, p.127-135, 2009.

DENG, J.; LIU, A.D.; HOU, G.Q.; ZHANG, X.; REN, K.; CHEN, X.Z.; CAO, X. A N-Acetilcisteína diminui as características malignas das células de glioblastoma ao inibir a sinalização Notch2. **Jornal de Pesquisa experimental e clínica do câncer**. v.38, n.1, p. 1-15, 2019.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 5.ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

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

GIMENEZ-CASSINA, A.; LIM, F.; DIAZ-NIDO, J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. **Journal Neuro Science Research**. v.84, n.4, p. 755-767, 2006.

GUO, S.; LIU, S.; BOU, G.; JIANG, L.; CHAI, Z. Fetal bovine serum promotes the development of *in vitro* porcine blastocysts by activating the Rho-associated kinase signalling pathway. **Reprod. Fertil. Dev.** v.31, n.2, p. 366-376, 2019.

HADJIKAKOU, S.K.; OZTURK II; BANTI C.N., KOURKOUHELIS, N.; HADJILIADIS, N. Recent advances on antimony(III/V) compounds with potential activity against tumor cells. **Journal Inorgânic Biochemistre**.v.153, p. 293-305, 2015.

HE, M. C. Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. **Environmental Geochemical Health**. v.29, p. 209–219, 2007.

HE, M.; WANG, N.; LONG, X.; ZHANG, C.; MA, C.; ZHONG, Q.; WANG, A.; WANG, Y.; PERVAIZ, A.; SHAN, J. Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. **Journal of Environmental Sciences**. v. 75, p.14-39, 2018.

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

JIANG, X.; YU, W.; WU, S.; TANG, L.; ZHONG, G.; WAN, F.; LAN, J.; ZHANG, H.; PAN, J.; TANG, Z.; ZHANG, X.; HU, L.; HUANG, R. Arsenic (III) and/or Antimony (III) induced disruption of calcium homeostasis and endoplasmic reticulum stress resulting in apoptosis in mice heart. **Ecotoxicolgy Environmental Saf.** 2021.

JIANG, X. K.; AN, Z.; LU, C.; CHEN, Y.; DU, E.; QI, S.; YANG, K.; ZHANG, Z.; XU, Y. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicology Letters**. 2016.

KIM, S.H.; YOON, J.T. Effect of serum-containing and serum-free culture medium-mediated activation of matrix metalloproteinases on embryonic developmental competence. **Czech Journal Animal Science**.v.64, n.12, p.473-482, 2019.

KING, R. B. **Encyclopedia of Inorganic Chemistry**. 2.ed. New York: Wiley, 2005.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. **Methods Molecular Biology**. p. 9-21, 2013.

KUROSAWA, H.; SHIMODA, Y.; MIURA, M.; KATO, K.; YAMANAKA, K.; HATA, A.; YAMANO, Y.; ENDO, Y.; ENDO, G. A novel metabolic activation associated with glutathione in dimethylmonothioarsinic acid (DMMTAV)-induced toxicity obtained from *in vitro* reaction of DMMTAV with glutathione. **Journal Trace. Elem. Med. Biol.** v.33, p.87-94, 2016.

KLOCHKO, K. Antimony. U.S. Geological Survey Mineral Commodity Summaries, 2020.

LECUREUR, V.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; FARDEL, O. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. **Int J Oncol.** v. 20, n. 5, p. 1071-1076, 2002.

LECUREUR, V.; LE THIEC, A.; LE MEUR, A.; AMIOT, L.; DRENOU, B.; BERNARD, M.; LAMY, T.; FAUCHET, R.; FARDEL, O. Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. **Br J Haematol.** v. 119, n.3, p. 608- 613, 2002.

LEUZ, A. K.; MONCH, H.; JOHNSON, C. A. Sorption of Sb (III) and Sb (V) to Goethite: Influence on Sb (III) Oxidation and mobilization. **Environmental Science Technology.** v. 40, p. 7277-7282, 2006.

LIN, Z. X.; HOULT, J. R.; RAMAN, A. SulphorhodamineB assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **Journal of ethnopharmacology.** v.66, p. 141-150.

LIN, X.; WANG, W.; MA, J.; SUN, Z.; HOU, H.; ZHAO, L. Study on molecular level toxicity of Sb (V) to soil springtails: using a combination of transcriptomics and metabolomics. **Science of the Total Environment.** v.761, 2021.

LIU, J.T.; BAIN, L.J. Arsenic inhibits hedgehog signaling during P19 cell differentiation. **Toxicology appl. Pharmacol.**v.281, n.3, p.243-253, 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,** v. 88 n.11, p.1047-1058, 2009.

LOMBÓ, G.C.; POSADAS, Y.; QUINTANAR, L.; GONSEBATT, M.; FRANCO, R. Neurotoxicity Linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: redox signaling and oxidative stress. **Antioxidant redox signal.**v.20, n.28, p. 1669-1703, 2018.

LOMBÓ, G.C.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M.I.; GONSEBATT, M.E.; FRANCO, R. Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. **Journal Biology Inorganic Chemistre.**v.24, n.8, p.1305-1316, 2019.

LONG, X.; WANG, X.; GUO, X.; HE, M. A review of removal technology fo antimony in aqueous solution. **Journal Environmental Science.** v.90, p.189-204, 2020.

LOPES, F.M.; SCHRODER, R.; FROTA JR, M.L.C.; ZANOTTO-FILHO, A.; MULLER, C.B.; PIRES, A.S.; MEURER, R. T.; COLPO, G.D.; GELAIN, D. P.; KAPCZINSKI, F.; MOREIRA, J. C. F.; FERNANDES, M. C.; KLAM, F. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkison disease studies. **Brain Research.** v.1337, p.85-94, 2010.

LOU, Y.; MA, C.; LIU, Z.; SHI, J.; ZHENG, G.; ZHANG, C.; ZHANG, Z. Antimony exposure promotes bladder tumor cell growth by inhibiting PINK1- Parking – mediated mitophagy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.221, p. 11-24, 2021.

MABWA, D.; KUBIENA, T.; PARNELL, H.; SU, R.; FURNISS, D.; TANG, Z.; LEACH, R.; BENSON, T. M.; SCOTCHFORD, C.A.; SEDDON, A.B. Evaluating the cytotoxicity of Ge-Sb-Se chalcogenide glass optical fibres on 3T3 mouse fibroblast. **RSC Advances**.v.11, n.15, p. 8682-8693, 2021.

MANN, K. K. et al. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicol Lett.**, v.160, n.2, p.158-70, 2006.

MATSUBARA, T. C. M. **Estudos sobre a determinação de antimônio em amostras ambientais pelo método de análise por ativação por nêutrons**. Validação da metodologia e determinação da incerteza da medição. Orientador: Mitiko Saiki. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisa Energéticas Nucleares, São Paulo, 2011.

McMICHAEL, B.D.; PEREGO, M.C.; DARLING, C.L.; PERRY, R.L.; COLEMAN, S.C.; BAIN, L. Long-term arsenic exposure impairs differentiation in mouse embryonal stem cells. **Journal Appl. Toxicology**. v.41, n. 7, p. 1089-1102, 2021.

MEDDA, N.; KUMAR DE, S.; MAITI, S. Different mechanisms of arsenic related signaling in cellular proliferation , apoptosis and neo –plastic transformation. **Ecotoxicology and Environment Safety**. v.208, n.15, 2021.

MULTANI, R.S.; FELDMANN, T., DEMOPOULOS, G.P. Antimony in the metallurgical industry: a review of its chemistry and environmental stabilization options. **Hydrometallurgy**. v.164, p.141-153, 2016.

MUN, S.E.; SIM, B.W.; YOON, S.B.; JEONG, P.S.; YANG, H.J.; CHOI, S.A. Dual effect of fetal bovine serum on early development depends on stage-specific reactive oxygen species demands in pigs. **Plos One**.v.12, n.4, 2017.

NELSON-MORA, J.; ESCOBAR, M.J.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L.; MASSIEU, L.; MONTIEL, T.; RODRIGUEZ, V.M.; HÉRNANDEZ-MERCADO, K.; GONSEBATT, M. E. Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs<sup>3+</sup>) after glutamate disposition in the mouse hippocampus and inotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment. **Arch. Toxicology**. v.92, p. 1037-1048, 2018.

NERI, T.S. **Desenvolvimento de um método para determinação de Sb (III) e Sb total em amostra de interesse ambiental utilizando geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama**. Orientador: Nivia Maria Melo Coelho. 2014. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K.A.; KORTSARIS, A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**. n. 208, p.151–158, 1997.

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

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishomaniose: Estado da arte. **Quim. Nova**. v.26, n.4, p. 550-555, 2003.

REN, M.; DING, S.; FU, Z.; YANG, L.; TANG, W. Seasonal antimony pollution caused by high mobility of antimony in sediments: In situ evidence and mechanical interpretation. **Journal of Hazardous Materials**. v.367, p. 427-436, 2019.

ROSS, R.A.; SPENGLER, B.A.; BIERDLER, J.L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. **Journal Natl Cancer Institute**. v.71, n.4, p 741-747, 1983.

RUGANI, N. J.; QUARESMA, P. F. Intraspecies susceptibility of Leishomania (Viannia) braziliensis to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 108, p. 1170 – 1180, 2018.

SADEGHI, M.; ENFERADI, M. Productions of <sup>122</sup>Sb for the study of environmental pollutions. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v.287, p. 585-589, 2010.

SHOTYK, W.; KRACHLER, M.; CHEN, B. Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. **Journal Environment Monit.** v.8, p. 288-292, 2006.

SHOTYK, W.; KRACHLER, M. Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage. **Environ. Science Technol.** v.41, n.5, p. 1560-1563, 2007.

SHIMAMOTO, G.G; KAZITORIS, B.; LIMA, L. F. R.; ABREU, N.D.; SALVADOR, V.T.; BUENO, M.I.M.S. Quantificação de Antimônio em garrafas de Politereftalato de Etileno (PET) brasileiras por fluorescência de raios-x e avaliação quimiométrica para verificar a presença de PET reciclado através do teor de Ferro. **Quim. Nova**. v. 37, n.8, p.1389-1393, 2011.

SHTANGEEVA, I.; BALI, R.; HARRIS, A. Bioavailability and toxicity of antimony. **Journal of Geochemical Exploration**. v.110, p. 40-45, 2011.

SIGMA - ALDRICH. Antimony (III) oxide - nanopowder. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/20/202649/202649-BULKALDRICH>. Acesso em 06 Ago. 2022.

SILVA, A.C. **Efeitos citotóxicos do trióxido de antimônio (Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) em diferentes linhagens celulares.** Orientador: Michele Dietrich Moura Costa. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

SONG, C. Financial Illiteracy and Person Contributions: A Field Experimento n Compound Interest in China. **The Review of Financial Studies.** v.33, n.2, p. 916-949, 2015

SU, L.; FANG, W.; ZHAO, X.; ZHU, L.; GAO, L.; CHEN, G. Disruption of mitochondrial redox homeostasis as a mechanism of antimony-induced reactive oxygen species and cytotoxicity. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2022.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **Int. Journal Environment Revist Public Health.** p.4267-4277, 2010.

SZYMKOWICZ, D.B.; SIMS, K.C.; SCHWENDINGER, K.L.; TATNALL, C.M.; POWELL, R.R.; BRUCE, T.F.; BRIDGES, W.C.; BAIN, L.J. Exposure to arsenic during embryogenesis impairs olfactory sensory neuron differentiation and function into adulthood. **Toxicology.**v.15, n.420, p.73-84, 2019.

TAMÁS, M.J.; SHARMA, S.K; IBLSTEDT, S.; JACOBSON, T.; CHRISTEN, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. **Biomolecules**, 2014.

TIRMENSTEIN, M.A.; PLEWS, P.I.; WLAKER, C.V.; WOOLERY, M.D.; WEY, H.E.; TORAAS, M.A. Estresse oxidativo induzido por antimônio e toxicidade em miócitos cardíacos cultivados. **Toxicol. Aplic. Farmácia.** p. 41-47, 1995.

TRIVELIN, L.A.; ROHWEDDER, J.J.R.; RATH, S. Determination of pentavalente antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection. **Talanta.** v.68, p. 1536-1543, 2006.

ULLAH, A.; ALI, N.; AHMAD, S.; RAHMAN, S.U.; ALGHAMDI, S.; BANNUNAH, A.M.; ALI, A.; AMAN, A.; KHAN, J.; HUSSAIN, H.; SAHIBZADA, M. U. K.Glycogen synthase kinase-3(GKS-3) a magic enzyme: it's in diabetes mellitus and glucose homeostasis, interactions with fluoroquioniones. A mini-review. **Braz Journal Biology.** 2021.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSAR, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and câncer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v.266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chemico-Biological Interactions.** v.160, p.1-40, 2006.

VARRICA, D., BARDELLI, F., DONGARRÀ, G., TAMBURO, E. Speciation of Sb in airborne particulate matter, vehicle brake linings, and brake pad wear residues. **Atmospheric Environment.** v.64, p.18–24, 2013.

VERBON, E.H.; POST, J.A.; BOONSTRA, J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**. v.511, n.1, p. 1-6, 2012.

VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. **Biotechnology Animal**. p.269-293, 2020.

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. **The Journal of Toxicological Sciences**. V.42, n.6, p. 783-792, 2016.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**. n.1, p. 1112-1116, 2006.

WAN, F.; ZHONG, G.; WU, S.; JIANG, X.; LIAO, J.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; MEHMOOD, K.; TANG, Z.; HU, L. Arsenic and antimony co-induced nephrotoxicity via autophagy and pyroptosis through ROS-mediated pathway *in vivo* and *in vitro*. **Ecotoxicology Environmentak saf**. 2021.

WANG, H.; CHEN, F.; MU, S.; ZHANG, D.; PAN, X.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Removal of antimony (Sb(V)) from Sb mine drainage: Biological sulfate reduction and sulfite oxidation- precipitation. **Bioresource Technology**. v. 146, p. 799-802, 2013.

WANG, A.; HE, M.; OUYANG, W; LIN, C.; LIU, X. Effects of antimony (III/V) on microbial activities and bacterial community structure in soil. **Science of the Total Environment**. v.789, 2021.

WANG, Q.; HE, M.; WANG, Y. Influence of combined pollution of Antimony and Arsenic on culturable soil microbial population and enzyme activities. **Ecotoxicology**. v.20, p.9-19, 2010.

WANG, X.; ZHU, P.; XU, S.; LIU, Y.; JIN, Y.; YU, S.; WEI, H.; LI, J.; ZHANG, Q.; HASEGAWA, T.; YAO, C.; YOSHIMURA, H.; WU, Q.; ZHAO, X. 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. **Int. J. Biochem Cell Biol**. 2019.

WISESSAOWAPAK, C.; VISITNINTHACHAI, D.; WATCHARASIT, P.; SATAYAVIVAD, J. Prolonged arsenic exposure increases ty phosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells: The contribution of GSK3 and ERK1/2. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.84, 2021.

WILSON, S.C., LOCKWOOD, P.V.; ASHLEY, P.M.; TIGHE, M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review. **Environmental Pollution** v.158. p. 1169-1181, 2010.

WU, Y.T.; WU, S.B.; LEE, W.Y.; WEI, Y.H. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. **Mitochondrial Research in Translational Medicine**. 2010.

WU, S.; ZHONG, G.; WAN, F.; JIANG, X.; TANG, Z.; HU, T.; RAO, G.; LAN, J.; HUSSAIN, R.; TANG, L.; ZHANG, H.; HUANG, R.; HU, L. Evaculation of toxic effects induced by arsenic trioxid or/and antimony on autophagy and apoptosis in testis of adult mice. **Environment Science Pollut. Res. Internacional**. v.28, n. 39, p.54647-54660, 2021.

XIE, H.; HU, L.; LI, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line *in vitro* cell modelo of dopaminergic neurons in Parkison´s disease. **China Med**. v.123, n.8, p. 1086-1092, 2010.

XU, S.; YANG, Z.; ZHI, Y.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, J.; TANG, J.; HE, H.; LU, M.; WANG, X.; WU, Q.; ZHAO, X. The effects of antimony on Alzheimer´s disease –like pathological changes in mice brain. **Science of the total environmental**.2020.

YEDDJOU, C.G.; TCHOUWOU, P.B. In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell electrophoresis (comet) assays. **Mol Cell Biochem**. p.123–130, 2007.

YU, S.; LI, Z.; ZHANG, Q.; WANG, R.; ZHAO, Z.; DING, W.; WANG, F.; SUN, C.; TANG, J.; WANG, X.; ZHANG, H.; HUANG, R.; WU, Q.; JIANG, J.; ZHAO, X. GPX4 degradation via chaperone-mediated autophagy conntributes to antimony-triggered neuronal ferroptosis. **Ecotoxicology Environmental Saf**. 2022.

ZHANG, C.; LI, P.; WEN, Y.; FENG, G.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; XU, Y.; ZHANG, Z. The promotion on cell growth of androgen-dependet protaste câncer by antimony via mimicking androgen activity. **Toxicology Letters**. v.288, p. 136-142, 2018.

ZHANG, C.; LU, C.; WANG, Z.; FENG, G.; DU, E.; LIU, Y.; WANG, L.; QIAO, B.; XU, Y.; ZHANG, Z. Antimony enhances c-Myc stability in prostate câncer via activating CtBP2-ROCK1 signaling pathway. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.164, p.61-68, 2018.

ZHAO, X.; XING, F.; CONG, Y.; ZHUANG, Y.; HAN, M.; WU, Z.; YU, S.; WEI, H.; WANG, X.; CHEN, G. Antimony trichloride induces a loss of cell viability via reactive oxygen species-dependent autophagy in A549 cells. **Internacional Journal Biochemistry Cell Biol**. v.93, p. 32-40, 2020.

ZHENG, Y.; DING, W.; ZHAO, Z.; WANG, R.; LI, Z.; YU, S.; LI, J.; ZHAO, X.; WU, Q. Antimony-induced astrocyte activation via mitogen-activated protein kinase activayion-dependent CREB phosphorylation. **Toxicology lett**. v.1, n.352, p.9-16, 2021.

ZHI, Y.; LU, G.; ZHU, G.; LI, Z.; ZHU, P.; LIU, Y.; SHI, W.; SU, L.; JIANG, J.; QU, J.; ZHAO, X. Positive regulation of the CREB phosphorylation via JNK-dependent pathway prevents antimony-induced neuronal apoptosis in PC12 cell and mice brain. **Neurotoxicology**. v.81, p. 101-108, 2020.

ZHONG, G.; WAN, F.; WU, S.; JIANG, X.; TANG, Z.; ZHANG, X.; HUANG, R.; HU, L. Arsenic or /and Antimony induced mitophagy and apoptosis associated with

metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice. **Science of the total Environment.** 2021.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLLOT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and Ros-induced Ros release. **Physiololy Rev.** v.94, p. 909-950, 2014.

ZHU, X.H.; SHEN, Y. L.; JING, Y.K. Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. **J Natl Cancer Inst.** v.91, p. 772–778, 1999.