



## ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE NÍQUEL EM *Drosophila melanogaster*

Letícia Mai Campagnaro Souza<sup>1</sup>

Raíne Fogliati de Carli<sup>2</sup>

Tatiane RochaCardozo<sup>2</sup>

Allan Seeber<sup>3</sup>

Wladimir Hernandez Flores<sup>3</sup>

Mauricio Lehmann<sup>4</sup>

Rafael Rodrigues Dihl<sup>5</sup>

### Resumo

Com o aumento da utilização da nanotecnologia na indústria e a dispersão das nanopartículas no ambiente, tornou-se essencial que o potencial toxicológico destes materiais fosse avaliado. Nanopartículas de óxido de níquel (NiO) são utilizadas em aplicações industriais, em produtos de uso diário, bem como cosméticos e protetores solares. Considerando a falta de estudos *in vivo* sobre a toxicidade genética de NPs de NiO, este estudo avaliou seu potencial genotóxico no teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram um aumento significativo na frequência de clones mutantes das moscas expostas a todas as concentrações no cruzamento padrão e no cruzamento aprimorado somente na concentração de 21 mg/mL. A genotoxicidade observada está associada a eventos mutacionais e/ou recombinacionais, já que são os parâmetros genéticos detectados no teste SMART.

Palavras-chave: SMART; óxido de níquel; mutação; recombinação

### Introdução

O aumento das pesquisas com materiais em escala nanométrica levou ao desenvolvimento de uma nova ciência, a nanotecnologia, que tem por objetivo acompanhar desde o processo de síntese até a utilização de nanomateriais (NMs) em diferentes produtos (DONALDSON et al., 2009). Este novo enfoque tecnológico tem despertado muitas expectativas em relação aos possíveis impactos dentro do contexto ambiental, de como podem alterar parâmetros biológicos e o quanto estes influenciam na preservação da vida e do ecossistema (BONACCORSI et al., 2006).

A importância de pesquisar diferentes materiais e suas estruturas, não só na escala macro mas agora na escala nanométrica, é essencial para o desenvolvimento tecnológico. Devido ao fato de os nanomateriais (NMs) terem suas dimensões reduzidas, estabelecidas entre 1 e 100 nanômetros (nm), suas propriedades diferem no que diz respeito à sua situação física, química e biológicas quando comparadas as que estão em uma escala maior (SEKHON, 2014). Estes estão sendo usados em diversos produtos comerciais, como plásticos, roupas, cosméticos, eletrodomésticos e até mesmo em alimentos. Suas aplicações se estendem para as áreas biomédicas, da saúde, do diagnóstico, além da utilização de nanocapsulas como carreadores na distribuição de substâncias/medicamentos em diferentes terapias. Além disso, existe uma grande demanda na indústria de cosméticos, de eletrônicos e têxtil (LOURO et al., 2013).

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de graduação Biomedicina – Bolsista PROBIC/FAPERGS – leticia.maicampagnaro@outlook.com

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

<sup>3</sup>Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

<sup>4</sup>Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

<sup>5</sup>Professor Orientador dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA ([rafael.rodriques@ulbra.br](mailto:rafael.rodriques@ulbra.br))

Com o avanço industrial, as nanopartículas (NPs) estão sendo liberadas sem controle no ambiente, interagindo com diferentes compartimentos ambientais, podendo facilmente atravessar as barreiras celulares devido as suas características nanométricas tornando-se necessário um levantamento quanto à sua toxicidade, pois estes dados permanecem desconhecidos (GUTIERREZ et al., 2015; VALDIGLESIAS et al., 2016). A caracterização, incluindo a distribuição de tamanho, forma, área superficial, cristalinidade, porosidade, estado de aglomeração, carga superficial, solubilidade a correlação entre as suas propriedades físico-químicas e os efeitos biológicos são fundamentais para esclarecer os processos genotóxicos (LI et al., 2008).

Assim, para avaliar a toxicidade e a genotoxicidade dos nanomateriais, estão sendo empregados tanto ensaios *in vivo* como *in vitro*. Dentre os ensaios relatados na literatura destacam-se o ensaio cometa, teste de micronúcleos, teste de aberrações cromossômicas e o teste de Ames (MAGDOLENOVA et al., 2014).

Dentro deste contexto, as NPs de óxido de níquel (NiO) estão sendo usadas em todo o mundo em produtos de consumo e aplicações industriais. Suas características incluem um alto nível de energia de superfície, alto magnetismo, baixo ponto de fusão, grande área superficial e baixo ponto de combustão, na qual permite sua aplicação em produtos comerciais, tais como catalisadores químicos, sensores, filme eletrocromico, dispositivos de armazenamento de energia, eletrodos de baterias, tintas de impressão, aditivo de combustível e sensores de materiais magnéticos (SALVADORI et al., 2014, DUAN et al., 2015).

Estudos realizados *in vitro* utilizando células brônquicas epiteliais humanas (BEAS-2B) em testes de citotoxicidade com NiO, pode-se observar uma diminuição de viabilidade celular com aumento na indução de apoptose (DUAN et al., 2015) Lu et al. (2015) também avaliaram o potencial citotóxico de NPs de NiO na linhagem celular A549. Neste estudo concluiu-se que esta NP diminuiu a viabilidade celular, produziu altas concentrações de EROs e induziu apoptose nesta linhagem.

Neste sentido, considerando a escassez de informações relacionadas à ação genotóxica *in vivo* de NPs de NiO, somado a ausência de dados referentes à sua atividade recombinogênica, o presente estudo utilizou o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* para avaliar a ação mutagênica e recombinogênica das NPs de óxido de níquel.

### **Metodologia**

A NPs de óxido de níquel foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados – Departamento de Engenharia Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas, Campus Bagé- RS (UNIPAMPA).

O Teste SMART de asa fornece uma rápida avaliação do potencial de um agente físico, químico ou biológico induzir a perda da heterozigosidade, relacionada à indução de mutação gênica e/ou cromossômica e recombinação homóloga somática. Esse ensaio faz uso de dois marcadores recessivos, pelos múltiplos (*mwh* 3-0.3) e flare (*flr*<sup>3</sup>, 3-38.8), utilizando o cruzamento padrão que apresenta níveis basais de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 e o cruzamento aprimorado, que apresenta níveis aumentados de enzimas desse complexo. O teste baseia-se na identificação de pelos com fenótipo mutante que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas e os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr*<sup>3</sup>, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pelos múltiplos (*mwh*), como pelos com a base alargada (*flr*<sup>3</sup>) estão presentes dentro de uma mesma mancha (GRAF et al., 1984).

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para tubos de ¼ L contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8h. Passado este

tempo, os adultos foram descartados. Depois de 72h do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio por flotação em água destilada.

As larvas obtidas do cruzamento padrão foram colocadas em frascos contendo 0,75 g de meio sintético, onde foram acrescentados 3 mL das soluções, sendo submetidas ao tratamento crônico expostas às diferentes concentrações de NP de NiO. A solução contendo as NPs foi preparada utilizando água destilada, que também foi usada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado uretano 20 mM. Todos os adultos nascidos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram submetidas à montagem de lâminas de vidro, contendo cinco pares de asas de machos e cinco pares de asas de fêmeas. Foram analisados 30 indivíduos de cada tratamento, sendo observados os fenótipos mutantes em microscópio óptico com aumento de 400 x.

## Resultados e Discussão

Para a avaliação da genotoxicidade das NPs de NiO foram testadas cinco diferentes concentrações, 1,31; 2,62; 5,25; 10,5 e 21 mg/mL no SMART. Tais concentrações foram determinadas a partir de experimento piloto, onde foram escolhidas doses que garantiram a sobrevivência de no mínimo 50% das moscas. Os dados obtidos em dois experimentos independentes foram agrupados, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados obtidos no cruzamento padrão e aprimorado após exposição crônica das larvas aos tratamentos estão demonstrados, respectivamente, nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr<sup>3</sup>*) no cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de NiO.

Cruzamento e Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas <sup>b</sup> m = 2	Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup>
		Manchas simples pequenas <sup>b</sup> (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes <sup>b</sup> (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5			
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>							
CN	50	0.58 (29)	0.10 (05)	0.00 (00)	0.68 (34)	34	
1,31	50	1.10 (55) +	0.14 (07) i	0.02 (01) i	1.26 (63) +	63	
2,62	50	1.00 (50) +	0.12 (06) i	0.06 (03) i	1.18 (59) +	59	
5,25	50	1.12 (56) +	0.14 (07) i	0.10 (05) i	1.36 (68) +	68	
10,5	50	0.88 (44) i	0.10 (05) i	0.04 (02) i	1.02 (51) +	51	
21	50	0.92 (46) +	0.10 (05) i	0.04 (02) i	1.06 (53) +	53	
CP	10	5.40 (54) +	0.70 (07) +	0.10 (01) i	6.20 (62) +	62	

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): -, negativo, +, positivo, i, inconclusivo. P<0.05. <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. <sup>d</sup>CN, controle negativo: água destilada. <sup>e</sup>CP, controle positivo: Uretano 20mM.

No que se refere aos resultados de genotoxicidade, no cruzamento padrão as NPs de NiO induziram aumentos significativos de clones mutantes para o total de manchas dos indivíduos trans-heterozigotos, quando comparado ao respectivo controle negativo, em todas as concentrações testadas, evidenciando que ocorreram alterações no material genético das células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Em contrapartida, no cruzamento aprimorado somente a maior concentração apresentou resultado positivo. A resposta negativa observada nas menores concentrações avaliadas demonstrou que, possivelmente, os altos níveis de enzimas de metabolização presentes na progênie deste cruzamento contribuíram para a eliminação da NPs antes que as mesmas causassem lesões no DNA.

Tabela 2 – Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr<sup>3</sup>*) no cruzamento aprimorado após exposição crônica de larvas de 3<sup>o</sup> estágio a diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de NiO.

Cruzamento e Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (n <sup>o</sup> . de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>					Total de manchas mwh <sup>c</sup>
		Manchas simples pequenas <sup>b</sup> (1–2 células) m = 2	Manchas simples grandes <sup>b</sup> (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas <sup>b</sup> m = 2		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>							
CN	50	0.98 (49)	0.08 (04)	0.02 (01)	1.08 (54)	52	
1,31	60	1.33 (80) -	0.08 (05) i	0.03 (02) i	1.45 (87) -	87	
2,62	60	1.27 (76) -	0.07 (04) i	0.08 (05) i	1.42 (85) -	85	
5,25	60	1.37 (82) f+	0.10 (06) i	0.07 (04) i	1.53 (92) -	91	
10,5	60	1.23 (74) -	0.10 (06) i	0.08 (05) i	1.42 (85) -	85	
21	50	1.56 (78) +	0.12 (06) i	0.02 (01) i	1.70 (85) +	85	
CP	10	23.40 (234) +	8.30 (83) +	5.40 (54) +	37.10 (371) +	365	

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): -, negativo, +, positivo, i, inconclusivo. P≤0.05. <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. <sup>d</sup>CN, controle negativo: água destilada. <sup>e</sup>CP, controle positivo: Uretano 20mM.

Resultados semelhantes utilizando o teste SMART têm sido relatados na literatura com diferentes NPs. Com a NP de prata (Ag) foi observado resultado positivo no cruzamento padrão em concentrações que variaram de 1-10 mM (DEMIR et al, 2011). Com NPs de cobre (Co) resultados semelhantes também foram observados no mesmo cruzamento nas concentrações de 5 e 10 Mm (VALES et al, 2013). No cruzamento aprimorado, NPs de óxido de zinco (ZnO) também apresentaram aumento na indução de clones mutantes na concentração de 12,5 Mm (REIS et al, 2015).

A genotoxicidade das diferentes NPs tem sido atribuída a diversos fatores, como a interação direta das mesmas com o material genético, danos indiretos devido à geração de EROs e liberação de íons tóxicos quando solubilizadas (KUMAR et al., 2013). Considerando que danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio estão relacionados com a indução de quebras de fita de DNA, é possível que o resultado positivo observado neste estudo esteja associado a um aumento na frequência de recombinação homóloga (RH) nas células proliferativas das larvas de terceiro estágio de *Drosophila melanogaster*.

RH é um dos principais processos de alterações genéticas envolvidas na gênese e progressão do câncer e ocorre com mais frequência em células proliferativas (BISHOP; SCHIESTL, 2001). Indivíduos que apresentam doenças associadas à maior predisposição para o desenvolvimento de câncer apresentam alta instabilidade genética e elevada taxa de RH (BISHOP; SCHIESTL, 2003). Portanto, este parâmetro é fundamental para ampliar o entendimento sobre os mecanismos associados à genotoxicidade de NPs de NiO.

### Conclusão

Devido ao grande investimento das indústrias tecnológicas e crescimento exponencial da produção nanotecnológica, é fundamental a investigação destes materiais com vistas ao seu potencial tóxico e genotóxico. Os resultados deste estudo demonstraram que as NPs de NiO são genotóxicas para as larvas de *Drosophila melanogaster*. Para que seja possível quantificar a real contribuição dos eventos recombinacionais para a genotoxicidade das NPs de NiO, é preciso que esta avaliação deva ser ampliada para a análise dos indivíduos heterozigotos TM3.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Edital Universal/ 2014 e à FAPERGS pela concessão da bolsa PROBIC.

### Referência bibliográfica:

BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1471, p. 109-121, 2001.

BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105, 2003.

BONACCORSI, A.; THOMA, G. Institutional complementarity and inventive performance in nano science and technology. **Research Policy**, v. 36, n. 6, p. 813-831, 2007.

DEMIR E, VALES G, KAYA B, CREUS A, MARCOS R. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. **Nanotoxicology**, v. 5, p. 417-24, 2011.

DUAN WX, He MD, MAO L, QIAN FH, Li YM, PI HF, et al. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, p. 80-91, 2015.

FREI H, WURGLER FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

GRAF U, WÜRGLER E, KATZ J, FREI H, JUON H, HALL B, KALE G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, p. 153-88, 1984.

GUTIERREZ ER, KAMENS RM, TOLOCKA M, SEXTON K, JASPERS I. A comparison of three dispersion media on the physicochemical and toxicological behavior of TiO<sub>2</sub> and NiO nanoparticles. **Chemico Biological Interactions** v. 236, p. 74-81, 2015.

KUMAR A e DHAWAN A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. **Archives Toxicology**, v. 87, p. 1883-1900, 2013.

LI, N.; XIA, T.; NEL, A. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1689-99, 2008.

LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. Nanomateriais manufacturados – Novos desafios para a saúde pública. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 8, 2013.

LU S, ZHANG W, ZHANG R, LIU P, WANG Q, SHANG Y, et al. Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 12, p. 1-12, 2015.

MAGDOLENOVA Z, COLLINS A, KUMAR A, DHAWAN A, STONE V, DUSINSKA M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, p. 1–46, 2013.

REIS EM, REZENDE AAA, SANTOS DV, OLIVERIA PF, NICOLELLA HD, TAVARES DC, et al. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 55-63, 2015.

SALVADORI MR, NASCIMENTO CAO, CORRÊA B. Nickel oxide nanoparticles film produced by dead biomass of filamentous fungus. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-6, 2014

SEKHON BS. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p. 31-53, 2014.

VALDIGLESIAS V, BERTÓLEZ NF, KILIÇ G, COSTA C, COSTA S, FRAGA S, et al. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2016.

VALES G, DEMIR E, KAYA B, CREUS A, MARCOS R. Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in *Drosophila*. **Nanotoxicology**, v. 7, p. 462-8, 2013.