



INVESTIGAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE NÍQUEL EM *Drosophila melanogaster*

Lucas Petitemberte de Souza¹
Raíne Fogliati de Carli²
Tatiane Rocha Cardozo²
Allan Seeber³
Wladimir Hernandez Flores³
Mauricio Lehmann⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵

Resumo

Nanopartículas (NPs) de óxido de níquel (NiO) são usadas na indústria em eletrodos de bateria, tintas de impressão e aditivos de combustível, aumentando o risco de exposição dos organismos. Do ponto de vista nanotoxicológico, os estudos são escassos em relação à ação genotóxica *in vivo* das NPs de NiO. Este estudo avaliou a atividade mutagênica e recombinogênica de NPs de NiO no Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. No bioensaio foram utilizados os cruzamentos padrão e aprimorado, sendo as moscas do aprimorado mais sensíveis à detecção de genotoxinas de ação indireta. Os resultados do cruzamento padrão apontaram para um aumento significativo na indução de clones mutantes em asas de moscas expostas a todas as concentrações testadas. Nas moscas do cruzamento aprimorado, observou-se aumento significativo na indução de clones mutantes apenas em indivíduos expostos à maior concentração testada, de 21 mg/mL. A análise dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo *TM3* revelou que a recombinação somática foi o principal mecanismo indutor das lesões. O teste demonstrou-se eficiente na detecção de NPs de NiO como potencial genotoxina. A avaliação de diferentes parâmetros genéticos faz-se necessária para caracterizar o perfil mutagênico das NPs de NiO com o objetivo de contribuir para uma melhor avaliação de risco quanto a utilização de NPs metálicas.

Palavras chave: mutação; recombinação; nanopartículas; níquel; SMART.

¹Aluno do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – Bolsista PIBITI/CNPq – lucasouza.contato@gmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaude)

³Professor da Universidade Federal do Pampa

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

⁵Professor dos cursos de Biomedicina, Ciências Biológicas/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA – rafael.rodrigues@ulbra.br

INTRODUÇÃO

A nanociência compreende o estudo e a manipulação de nanomateriais ou nanopartículas (NPs). O termo nanopartícula refere-se à objetos e dispositivos cujas proporções físicas não excedam algumas dezenas de nanômetros (MELO; PIMENTA, 2004). Esta ciência está associada à nanotecnologia, sendo caracterizada como um campo multidisciplinar importante, pois abrange áreas como física, química, biologia, farmácia, engenharia e até medicina, com ampla aplicabilidade na área econômica. Logo, as NPs tem sido encontradas em materiais diversos, na produção de energia, eletrônicos, alimentos, medicamentos, cosméticos, setor óptico e de remediação (FERNANDES; FIGUEIRAS, 2008).

Os seres humanos têm sido expostos as NPs transportadas pelo ar durante todo o seu período evolutivo. Essa exposição aumentou ao longo do século à medida que atividades antropogênicas ganharam força (OBERDÖRSTER et al., 2005). Estas entram no corpo humano principalmente por sua inalação, e secundariamente por injeção, contato dérmico ou ingestão, se estiverem presentes nos medicamentos ou alimentos. Os principais alvos são os pulmões e os rins (PIOTROWSKA et al., 2009; MAGAYE et al., 2012).

As NPs de NiO são novas e têm sido largamente utilizadas na indústria nos últimos anos em catalisadores químicos, sensores, dispositivos de armazenamento de energia, eletrodos de baterias, tintas de impressão, aditivo de combustível e sensores de materiais magnéticos. Suas características incluem elevado nível de energia de superfície, alto magnetismo, baixo ponto de fusão, grande área superficial e baixo ponto de combustão. (Magaye et al., 2012). Ao considerar a escassez de informações referente à atividade genotóxica *in vivo* das NPs de NiO, o presente estudo avaliou as atividades mutagênica e recombinogênica das NPs de NiO no Teste para Avaliação de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

METODOLOGIA

O teste SMART tem como princípio, analisar a perda da heterozigosidade de genes marcadores, que se expressam nas asas de *D. melanogaster*. As alterações genéticas nas células podem ser identificadas fenotipicamente através de manchas mutantes na superfície das asas de um indivíduo adulto, que expressam os genes marcadores *flr³* ou *mwh*, responsáveis pelas mudanças na forma estrutural ou quantitativa dos pelos (ANDRADE et al., 2004).

As linhagens utilizadas neste experimento foram as flr^3 , $ORR;flr^3$ e mwh . O cruzamento padrão (CP) consiste em cruzar fêmeas virgens flr^3 com machos mwh e o cruzamento aprimorado(CA) caracteriza-se por cruzar fêmeas virgens $ORR;flr^3$ e machos mwh . Ambos os cruzamentos dão origem a larvas com duas constituições genótípicas: larvas trans-heterozigotas para os marcadores recessivos mwh e flr^3 e larvas heterozigotas para o cromossomo $TM3$.

As NPs de NiO foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados – Departamento de Engenharia e Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas, Campus Bagé – RS (UNIPAMPA) pelos professores colaboradores Dr. Allan Seeber e Dr. Wladimir Flores.

Os cruzamentos foram realizados em massa, portanto, os casais foram transferidos para tubos de ¼ L contendo meio de ovoposição e, posteriormente, foram descartados. Após 72h do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio. As larvas foram colocadas em tubos com meio sintético e 3 mL das soluções, sendo submetidas ao tratamento crônico em cinco diferentes concentrações das NPs de NiO: 1,31; 2,62; 5,25; 10,5 e 21 mg/mL, bem como os controles: negativo (água destilada) e positivo (uretano 20mM). Ao final, foram retiradas as asas das moscas, para montagem das lâminas e posterior leitura em microscopia óptica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao CP apresentados na tabela 1 mostraram que todas as concentrações de NPs de NiO foram genotóxicas quando comparadas ao controle negativo. Após a análise dos indivíduos $TM3$, foi possível observar que o principal mecanismo indutor de danos no material genético foi a recombinação homóloga. Na tabela 2 são apresentados os resultados referentes ao CA, onde apenas a maior concentração apresentou resultado positivo quanto à genotoxicidade nas larvas trans-heterozigotas. Com a análise dos indivíduos $TM3$, foi obtido o mesmo resultado que no CP, onde a recombinação homóloga contribuiu de forma majoritária na indução de danos causados no DNA das células.

Na literatura, não há dados, até o presente estudo, sobre a avaliação da genotoxicidade *in vivo* das NPs de NiO. Contudo, outros dados semelhantes têm sido relatados utilizando o teste SMART. Em um estudo realizado com a NP de Ag, foi possível observar resultados positivos no CP em concentrações que variaram de 1-10 mM (DEMIR et al., 2011). Com NPs de Co obteve-se resultados semelhantes, observados no mesmo cruzamento, nas concentrações de 5 e 10 mM (Vales et al., 2013). No CA, NPs de óxido de zinco (ZnO)

também apresentaram aumento na indução de clones mutantes na concentração de 12,5 mM (REIS et al., 2015).

Tabela 1 – Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr³*) e heterozigota para o cromossomo TM3 (*mwh/TM3*) no cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de NiO

Genótipos	Concentrações e controles (mg/mL)	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas)/Diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas com clones <i>mwh</i> ^b (n)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ céls. por divisão celular) ^c (n/CN) ^{d,e}	Recombinação (%) ^f	Mutações (%) ^g
			Mancha simples pequena ^h (1-2 cél.) (m = 2)	Mancha simples grandes ^h (>2 cél.) (m = 5)	Mancha gêmea (m = 5)	Total de manchas (m = 2)				
<i>mwh / flr³</i>	CP	10	5.40 (54) +	0.70 (07) +	0.10 (01) i	6.20 (62) +	62	12.70 [11.31]		
	CN	50	0.58 (29)	0.10 (05)	0.00 (00)	0.68 (34)	34	1.39		
	1,31	50	1.10 (55) +	0.14 (07) i	0.02 (01) i	1.26 (63) +	63	2.58 [1.19]	106.90	-6.90
	2,62	50	1.00 (50) +	0.12 (06) i	0.06 (03) i	1.18 (59) +	59	2.42 [1.02]	120.00	-20.00
	5,25	50	1.12 (56) +	0.14 (07) i	0.10 (05) i	1.36 (68) +	68	2.79 [1.39]	97.06	2.94
	10,50	50	0.88 (44) i	0.10 (05) i	0.04 (02) i	1.02 (51) +	51	2.09 [0.70]	70.59	29.41
	21	50	0.92 (46) +	0.10 (05) i	0.04 (02) i	1.06 (53) +	53	2.17 [0.78]	57.89	42.11
<i>mwh / TM3</i>	CN	50	0.42 (21)	0.00 (00)	^h	0.42 (21)	21	0.86		
	1,31	50	0.34 (17) -	0.04 (02) i		0.38 (19) -	19	0.78 [-0.08]		
	2,62	50	0.32 (16) -	0.00 (00) i		0.32(16) -	16	0.66 [-0.20]		
	5,25	50	0.44 (22) -	0.00 (00) i		0.44 (22) -	22	0.90 [0,04]		
	10,50	50	0.50 (25) i	0.02 (01) i		0.52 (26) -	26	1.07 [0.20]		
	21	50	0.52 (26) i	0.06 (03) i		0.58 (29) -	29	1.19 [0.33]		

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): +, positivo; i, inconclusivo; -, negativo; m: fator de multiplicação; níveis de significância $\alpha = \beta = 0.05$; ^bincluindo as manchas raras individuais *flr3*; ^cconsiderando manchas *mwh* de simples *mwh* e manchas gêmeas; ^dnúmeros entre colchetes é a frequência de indução espontânea corrigida pela incidência estimada do controle negativo; ^epara o cálculo ver Andrade et al. (2004); ^fC=48.800, i.e., número aproximado de células analisadas por mosca; ^gPorcentagem de recombinação (R) foi calculado de acordo com Frei e Würgler (1996): $R = 1 - [(n/CN^* \text{ em moscas } mwh/TM3)/(n/CN^* \text{ em moscas } mwh/flr3)] * 100$; ^hApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas em heterozigotos *mwh/TM3* já que o cromossomo balaceador TM3 não contém o gene mutante *flr3*. Frequência de controle corrigida foi usada para estes cálculos. CN = Controle Negativo utilizado: água destilada. CP= Controle Positivo usado: Uretano 20 mM.

Tabela 2 – Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr3*) e heterozigota para o cromossomo TM3 no cruzamento aprimorado (CA) após exposição crônica de larvas de 3º estágio as diferentes concentrações de NiO

Genótipos	Concentrações e controles (mg/mL)	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas)/Diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas com clones <i>mwh</i> ^b (n)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ céls. por divisão celular) ^c (n/CN) ^{d,e}	Recombinação (%) ^f	Mutações (%) ^g
			Mancha simples pequena ^h (1-2 cél.) (m = 2)	Mancha simples grandes ^h (>2 cél.) (m = 5)	Mancha gêmea (m = 5)	Total de manchas (m = 2)				
<i>mwh / flr³</i>	CP	10	23.40 (234) +	8.30 (83) +	5.40 (54) +	37.10 (371) +	365	74.80 [72.66]		
	CN	50	0.98 (49)	0.08 (04)	0.02 (01)	1.08 (54)	52	2.13		
	1,31	60	1.33 (80) -	0.08 (05) i	0.03 (02) i	1.45 (87) -	87	2.97 [0.84]		
	2,62	60	1.27 (76) -	0.07 (04) i	0.08 (05) i	1.42 (85) -	85	2.90 [0.77]		
	5,25	60	1.37 (82) f+	0.10 (06) i	0.07 (04) i	1.53 (92) -	91	3.11 [0.98]		
	10,50	60	1.23 (74) -	0.10 (06) i	0.08 (05) i	1.42 (85) -	85	2.90 [0.77]		
	21	50	1.56 (78) +	0.12 (06) i	0.02 (01) i	1.70 (85) +	85	3.48 [1.35]	84.85	15.15
<i>mwh / TM3</i>	CN	50	1.12 (56)	0.06 (03)	^h	1.18 (59)	59	2.42		
	21	50	1.26 (63) -	0.02 (01) i		1.28 (64) -	64	2.62 [0.20]		

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): +, positivo; i, inconclusivo; -, negativo; m: fator de multiplicação; níveis de significância $\alpha = \beta = 0.05$; ^bincluindo as manchas raras individuais *flr3*; ^cconsiderando manchas *mwh* de simples *mwh* e manchas gêmeas; ^dnúmeros entre colchetes é a frequência de indução espontânea corrigida pela incidência estimada do controle negativo; ^epara o cálculo ver Andrade et al. (2004); ^fC=48.800, i.e., número aproximado de células analisadas por mosca; ^gPorcentagem de recombinação (R) foi calculado de acordo com Frei e Würgler (1996): $R = 1 - [(n/CN^* \text{ em moscas } mwh/TM3)/(n/CN^* \text{ em moscas } mwh/flr3)] * 100$; ^hApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas em heterozigotos *mwh/TM3* já que o cromossomo balaceador TM3 não contém o gene mutante *flr3*. Frequência de controle corrigida foi usada para estes cálculos. CN = Controle Negativo utilizado: água destilada. CP= Controle Positivo usado: Uretano 20 mM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste demonstrou-se eficiente na detecção de NPs de NiO como potencial genotoxina. Entretanto, a avaliação de diferentes parâmetros genéticos, utilizando diferentes bioensaios, faz-se necessária para caracterizar o perfil mutagênico das NPs de NiO.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R.; REGULY L.; Lehmann M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed.), **Drosophila Cytogenetics Protocols**, Humana Press Inc. Totowa, p.389-412, 2004.
- DEMIR, E.; VALES, G.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. **Nanotoxicology**, v. 5, p. 417-24, 2011.
- FERNANDES, M. F. M.; FIGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v. 31, p. 2205-13, 2008.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. 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.
- MAGAYE, R.; ZHAO, J.; BOWMAN, L.; DING, M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt, nickel and copper based nanoparticles (review). **Experimental and therapeutic medicine**, v. 4, p. 551-61, 2012.
- MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, p. 18:21, 2004.
- PIETRUSKA, J.R.; LIU, X.; SMITH, A.; McNEIL, K.; WESTON, P.; ZHITKOVICH, A.; et al. B. Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 α activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles. **Toxicology Science**, v. 124, p. 138-48, 2011
- OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTE, E.; OBERDÖRSTE, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 823–39, 2005.
- REIS, E. M.; REZENDE, A. A. A.; SANTOS, D. V.; OLIVEIRA, P. F.; NICOLELLA, H. D.; TAVARES, D. C.; 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.
- 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.