

AVALIAÇÃO, *IN VIVO*, DA TOXICIDADE GENÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Christine Melgarejo Lences¹

Tatiane Rocha Cardozo²

Raíne Fogliati de Carli³

Allan Seeber⁴

Wladimir Hernandez Flores⁵

Mauricio Lehmann⁶

Rafael Rodrigues Dihl⁷

RESUMO

Devido ao aumento da utilização da nanotecnologia na indústria e a dispersão das nanopartículas no ambiente, é essencial que o potencial toxicológico destes materiais seja avaliado. Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) são utilizadas em produtos de uso diário e aplicações industriais. Este estudo avaliou a toxicidade genética de nanopartículas de ZnO no teste para detecção de recombinação e mutação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram um aumento significativo na frequência de clones mutantes das moscas expostas à concentração de 1,2 mg/mL. A genotoxicidade observada está associada a eventos mutacionais e/ou recombinacionais, já que são os parâmetros genéticos detectados no teste SMART. Os resultados deste estudo contribuíram para a caracterização do perfil genotóxico de nanopartículas de ZnO.

Palavras-chave: Nanomateriais, SMART, *Drosophila melanogaster*, genotoxicidade.

ABSTRACT

Due to increasing use of nanotechnology in industry and the dispersion of nanoparticles in the environment, it is essential that the toxicological potential of these materials is evaluated. Nanoparticles of zinc oxide (ZnO) are in everyday use products and industrial applications. This study evaluated the genetic toxicity of ZnO nanoparticles in the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. The results showed a significant increase in the frequencies of mutant spots of the flies exposed to a concentration of 1.2 mg/ml of ZnO nanoparticles. The observed genotoxicity is associated with mutational and/or recombinational events, since these

¹ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PIBITI/CNPq

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

³ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

⁴ Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

⁵ Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

⁶ Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

⁷ 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.rodrigues@ulbra.br)

are genetic parameters detected in the SMART test. The results of this study contributed to the characterization of the genotoxic profile of ZnO nanoparticles.

Keywords: Nanomaterials, SMART, *Drosophila melanogaster*, genotoxicity.

INTRODUÇÃO

O aumento das pesquisas com materiais nanométricos levou ao desenvolvimento de uma nova ciência, a nanotecnologia, que participa desde o processo de síntese até a utilização de nanomateriais (NMs) em diferentes produtos (TSUJI et al., 2006; DONALDSON et al., 2009). A nanotoxicologia surgiu como uma nova linha de pesquisa da toxicologia, para investigar os efeitos adversos de nanomateriais sobre a saúde humana e animal (WARHEIT et al., 2008). A preocupação com a segurança destes materiais deve ser levada em consideração, pois a utilização de produtos com nanopartículas (NPs) manufaturadas tem aumentado. As NPs são liberadas nos ecossistemas e podem interagir em nível celular, devido as suas características nanométricas (MOORE, 2006; CRANE et al., 2008).

NPs de óxido de zinco (ZnO) estão sendo usadas em todo o mundo em produtos de consumo e aplicações industriais. Estas têm alto índice de refração e brilho, sendo regularmente utilizadas como pigmentos de clareamento e apresentam propriedades específicas que permitem a aplicação em produtos comerciais, tais como tintas e agentes de branqueamento nos produtos alimentares. Suspensões de NPs de ZnO, são amplamente utilizadas em produtos cosméticos, de cuidados com a pele e de proteção solar. Alguns trabalhos têm relatado o potencial citotóxico e genotóxico em células eucarióticas das NPs de ZnO (SHARMA et al.; 2009, OSMAN et al., 2010).

Nesse contexto, 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). A combinação de *testes in vitro* e *in vivo* é útil na identificação de danos genotóxicos. Desta forma, uma série de testes de curta duração pode ser empregada para a caracterização dos danos genéticos induzidos por NMs, permitindo definir o risco ambiental imposto por NPs de ZnO e incentivando a aplicação de medidas de prevenção que visam à redução da carga genotóxica associada a estas partículas (DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009).

Considerando a falta de estudos *in vivo* sobre a toxicidade genética de NPs de ZnO, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico destas NPs no teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. O Teste SMART de asa baseia-se na identificação de pelos com fenótipos mutantes que representam a ocorrência de lesões em nível de DNA. Os pelos mutantes organizam-se em manchas, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais (ANDRADE et al., 2004; DIHL et al., 2008; THOMÉ et al., 2012).

MATERIAIS E MÉTODOS

Agentes químicos e materiais nanoestruturados

Como diluente e controle negativo foi utilizado água destilada e deionizada. Como controle positivo foi utilizado Uretano (CAS 51-79-6) obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. As NPs, com tamanho médio de 50 nM, foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados do Departamento de Engenharia e Energias Renováveis da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Bagé - RS.

Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)

O ensaio fez uso de duas linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster*, portadoras de genes marcadores específicos, localizados no cromossomo 3. Tais linhagens são designadas como *flr³* e *mwh* e o cruzamento entre essas linhagens dá origem a larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores: larvas *mwh* +/ + *flr³* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* e larvas *mwh*+/*TM3, Bd^S* - heterozigotas para o cromossomo TM3, necessário para balancear o marcador *flr³*, já que este é letal em homozigose (GARCIA-BELLIDO; DAPENA, 1974). Os adultos heterozigotos para o cromossomo TM3 apresentam recortes nas asas, determinados pelo gene marcador *Bd^S*, o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato redondo normal.

Sendo assim, as larvas provenientes desses cruzamentos foram submetidas aos tratamentos com as diferentes concentrações de NPs de ZnO e controles negativo e positivo. Após o nascimento desses indivíduos tratados, as asas dos adultos foram retiradas e submetidas à montagem em lâminas de vidro contendo cinco pares de asas de machos e cinco pares de asas de fêmeas. A análise dessas lâminas foi feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes onde se fez uma varredura de ambos os lados ventral e dorsal das asas em busca dos fenótipos mutantes.

Foram analisados 30 indivíduos de cada tratamento, observando-se manchas com os fenótipos pelos múltiplos e/ou pelos com a base alargada, refletindo a expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou *flr³*, respectivamente. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr³*, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pelos múltiplos (*mwh*), como pelos com a base alargada (*flr³*) estão presentes dentro de uma mesma mancha (GRAF et al., 1984).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da comparação dos resultados obtidos nos diferentes tratamentos com aqueles obtidos no controle negativo. Para tanto, utilizamos o teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação da genotoxicidade das NPs de ZnO foram testadas quatro diferentes concentrações, 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 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 após exposição crônica das larvas aos tratamentos estão demonstrados na tabela 1. A frequência do controle negativo foi 1,13 para a progênie trans-heterozigota, o que está em conformidade com relatos da literatura (DIHL et al., 2008; BURGOS et al., 2014). Para cada concentração são apresentadas as frequências de manchas simples pequenas, simples grandes, manchas gêmeas e o total de manchas que representa a genotoxicidade final das NPs de ZnO. No que se refere aos resultados de genotoxicidade, NPs de ZnO induziram aumentos significativos na indução de clones mutantes para o total de manchas dos indivíduos trans-heterozigotos, quando comparado ao respectivo controle negativo (Tabela 1). Os resultados positivos foram observados na concentração de 1,2 mg/mL, evidenciando que NPs de ZnO induziram alterações no material genético das células somáticas de *Drosophila melanogaster*. De fato, o aumento das frequências de clones mutantes para manchas simples pequenas (2,40) e manchas simples grandes (0,33) refletiu a positividade observada para o total de manchas (2,80). Por outro lado, houve resposta negativa observada nas menores concentrações avaliadas, 0,15; 0,3 e 0,6 mg/mL.

Tabela 1 – Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr³*) no cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de ZnO.

Cruzamento e Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes ^b (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas ^b m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
CN	30	1,07 (32)	0,03 (01)	0,03 (01)	1,13 (34)	34
0,15	30	1,33 (40) -	0,30 (09) +	0,00 (00) i	1,63 (49) i	45
0,3	30	0,67 (20) -	0,10 (03) i	0,00 (00) i	0,77 (23) -	23
0,6	30	0,63 (19) -	0,17 (05) i	0,10 (03) i	0,90 (27) -	26
1,2	30	2,40 (72) +	0,33 (10) +	0,07 (02) i	2,80 (84) +	82
CP	10	23,10 (231) +	4,10 (41) +	3,00 (30) +	30,20 (302) +	285

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): -, negativo, +, positivo, i, inconclusivo. P≤0.05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. CN, controle negativo: água destilada. CP, controle positivo: Uretano 20mM.

As NPs de ZnO têm sido relatadas em alguns trabalhos por seu potencial citotóxico e genotóxico em células eucarióticas (SHARMA et al., 2009; OSMAN et al., 2010). SHARMA et al., 2012 investigaram o potencial genotóxico das NPs de ZnO em células de fígado humano, HepG2. Os resultados desse trabalho mostraram que houve genotoxicidade dependente do tempo de exposição no ensaio cometa. NPs de ZnO foram capazes de atrasar o desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio*, diminuindo a sua sobrevivência e eclosão, causando danos nos tecidos. Outro estudo, utilizando diferentes organismos aquáticos, verificou efeitos tóxicos quando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Tamnocephalus platyuru* foram expostos a NPs de ZnO (HEINLAAN et al., 2008).

Devido ao seu tamanho extremamente pequeno, NPs de ZnO podem interagir diretamente com macromoléculas, como o DNA. O principal mecanismo indutor de lesões parece estar associado com a indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. SHARMA et al. (2009) demonstraram que NPs de ZnO foram genotóxicas em células epidermais humanas (A431) por meio da indução de espécies reativas de oxigênio.

O teste SMART detecta simultaneamente vários parâmetros genéticos, como mutação gênica, mutação cromossômica, induzida por eventos aneugênicos e clastogênicos, assim como a recombinação somática (ANDRADE et al., 2004). De fato, o SMART, em função da localização dos genes marcadores no cromossomo 3 de *Drosophila melanogaster*, é um teste sensível para a detecção de eventos associados a recombinação homóloga (RH) (DIHL et al., 2008). A RH, em células eucarióticas proliferativas, é um dos principais mecanismos de reparação de quebras duplas de fitas do DNA, que pode levar a perda de heterozigosidade de genes envolvidos com a regulação do ciclo celular ou resultar na formação de rearranjos cromossômicos (BISHOP; SCHIESTL, 2003).

Considerando que danos oxidativos induzidos 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 RH nas células proliferativas das larvas de terceiro estágio de *Drosophila melanogaster*. Dessa forma, os resultados apontam para a indução de RH como um dos principais mecanismos indutores de alterações genéticas associados à exposição às NPs de ZnO, no teste SMART.

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 possuem 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 ZnO.

CONCLUSÕES

Devido ao grande investimento das indústrias tecnológicas em relação ao crescimento exponencial da produção nanotecnológica, é fundamental a investigação

destes materiais com vistas ao potencial tóxico e genotóxico. A nanotecnologia tornou-se um sinônimo de inovação, abrindo portas para um mercado promissor. Os resultados deste estudo demonstraram que as NPs de ZnO, na concentração de 1,2 mg/mL, são genotóxicas para as larvas de *Drosophila melanogaster*. É preciso salientar que esta avaliação deve ser ampliada com a análise dos indivíduos heterozigotos TM3, para que seja possível quantificar a real contribuição dos eventos recombinacionais para a genotoxicidade das NPs de ZnO.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo no. 457283/2014-9) e pela concessão da bolsa PIBITI.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Humana Press Inc., 2004. v. 247, p. 389-412.
- BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1471, p. 109-121, 2001.
- _____. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105, 2003.
- BURGOS, L. et al. In vivo and in vitro genotoxicity assessment of 2-methylisoborneol, causal agent of earthy-musty taste and odor in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.100, p. 282–286, 2014.
- CRANE, M. et al. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 421–437, 2008.
- DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR, D. Nanomaterials: A challenge for toxicologists. **Nanotoxicology**, v. 3, p.1–9, 2009.
- DIHL, R. R. et al. Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2344-2348, 2008.
- DONALDSON, K. et al. The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, p. 13–20, 2009.
- FREI, H.; WÜRGLER, E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

- GARCIA-BELLIDO, A.; DAPENA, J. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and General Genetics**, v. 128, p. 117-130, 1974.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.
- HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, p. 1308–1316, 2008.
- KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527-549, 1970.
- MAGDOLENOVA, Z. et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, p. 233-278, 2014.
- MOORE N. Nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, p. 967-976, 2006.
- OSMAN, F. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in Hep-2 cells. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1193–1203, 2010.
- SHARMA, V. et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology Letters**, v. 185, p. 211-218, 2009.
- SHARMA, V; ANDERSON, D; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and Ros-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**, v. 17, p. 852-870, 2012.
- THOMÉ, S. et al. Recombinagenic and mutagenic activities of fluoroquinolones in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 742, p. 43-47, 2012.
- TSUJI, S. et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: Risk assessment of nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 89, p. 42-50, 2006.
- WARHEIT, B. et al. Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 120, p. 35-42, 2008.