

Avaliação *in vitro* da neurotoxicidade de nanopartículas de magnetite revestidas por sílica

Carla Costa¹, Fátima Brandão¹, Gözde Kiliç²,
Natalia Fernández-Bertólez², Maria João Bessa¹, Solange Costa¹,
Vanessa Valdiglesias³, Blanca Laffon³, João Paulo Teixeira¹

carla.trindade@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, INSA, Porto.

(2) Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade da Corunha.

(3) Grupo DICOMOSA. Departamento de Psicobiologia, Universidade da Corunha.

Introdução

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) são promissores agentes de contraste em ressonância magnética podendo vir a melhorar significativamente o diagnóstico de diversas doenças entre as quais cancro, doenças cardiovasculares e neurológicas. Diferentes tipos de SPION, tais como, as Feridex IV®, Resovist®, Combidex®, Lumirem® e Clariscan™ chegaram mesmo a ser introduzidas no mercado internacional como agentes de contraste, mas todas foram entretanto retiradas do mercado, exceto as SPION Lumirem®. Para além da utilização como agentes de contraste, as propriedades superparamagnéticas destas nanopartículas potenciam também a sua aplicação para a entrega localizada de fármacos (1,2) e destruição direcionada de tecidos tumorais através de hipertermia (3,4).

Apesar dos possíveis benefícios e promissoras aplicações das SPION, ainda são pouco conhecidos os efeitos destas nanopartículas no sistema nervoso humano, pelo que se considera necessária a avaliação da toxicidade destas nanopartículas em linhas celulares do sistema nervoso humano (5).

Com este estudo, pretende-se avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄, magnetite) revestidas por sílica (ION-S) numa linha celular humana de origem neuronal (SHSY5Y).

Material e métodos

A caracterização físico-química das ION-S foi efetuada por dispersão dinâmica da luz (DLS) para determinação do tamanho e estabilidade da suspensão, e microscopia eletrónica de transmissão (TEM) para análise do tamanho primário. O tamanho hidrodinâmico e potencial zeta foram determinados em suspensões preparadas em água e meio de cultura celular.

O cultivo da linha celular e preparação das células para os tratamentos com ION-S foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Valdiglesias *et al.*, 2013 (6).

As células SHSY5Y foram expostas a diferentes concentrações de ION-S (5-300 µg/mL), preparadas imediatamente antes do tratamento, em meio de cultura, durante três tempos de exposição (3, 6, 24 h). A viabilidade celular foi avaliada após o período de exposição através do ensaio MTT (7); uma solução Triton X-100 a 1% foi utilizada para controlo positivo.

A avaliação da genotoxicidade foi efetuada recorrendo ao teste do cometa, tendo sido analisados 4 níveis de concentração (10, 50, 100 e 200 µg/mL) e dois períodos de exposição (3 e 24 h). O ensaio foi executado de acordo com anteriormente descrito em Costa *et al.* 2008 (8), tendo sido utilizada bleomicina 1 µg/mL como controlo positivo. Para cada condição experimental foram realizadas três experiências independentes (com três replicas por experiência).

Resultados e discussão

Os resultados da caracterização físico-química das suspensões de ION-S estão apresentados na tabela 1. A análise TEM mostrou que as nanopartículas em estudo apresentam um tamanho de cerca de 20 nm. Em dispersão, verificou-se que o tamanho das ION-S em água é semelhante ao seu tamanho em meio de cultura celular (cerca de 100 nm). Relativamente ao potencial zeta, o valor absoluto em meio de cultura é bastante inferior ao valor absoluto obtido em água ultra pura, o que traduz uma diminuição da estabilidade nas ION-S neste meio.

Tabela 1: Caracterização físico-química das nanopartículas em estudo.

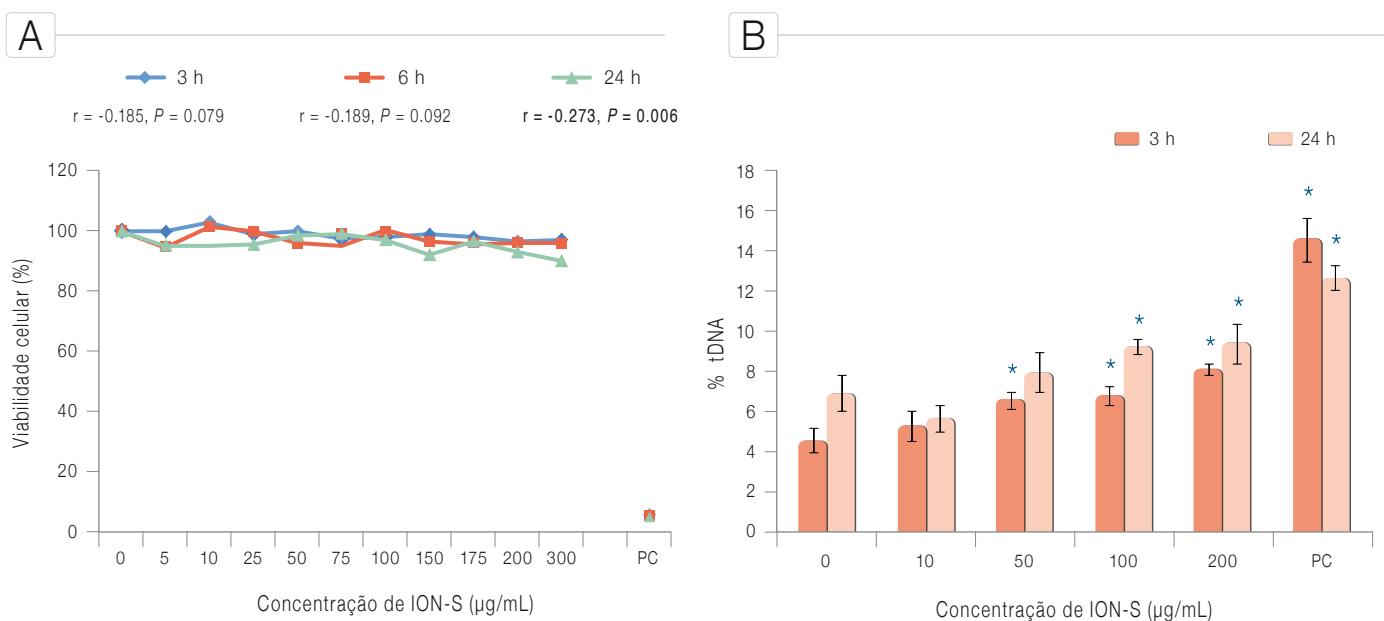
		ION-S
Tamanho primário (nm)*		10.0 ± 2.1 (núcleo) 20.2 ± 2.9 (núcleo e revestimento)
ION-S em água (300 µg/mL)*	Tamanho hidrodinâmico (nm)	93.3 ± 0.5
	Potencial zeta (mV)	-31.8 ± 2.1 (pH=7.73)
ION-S em meio de cultura (300 µg/mL)*	Tamanho hidrodinâmico (nm)	111.1 ± 1.1
	Potencial zeta (mV)	-10.3 ± 1.1 (pH=8.14)

* média ± desvio padrão

O gráfico 1A apresenta os resultados obtidos no ensaio MTT. A análise da correlação entre a viabilidade celular e a dose de exposição mostra uma diminuição na viabilidade celular estatisticamente significativa apenas para o período de exposição de 24 h. No entanto, mesmo para a dose mais elevada (300 µg/mL), a viabilidade celular manteve-se acima dos 80% confirmando a sua biocompatibilidade, à semelhança do que já foi descrito por outros autores (9).

Tendo em consideração estes resultados, foram selecionadas 4 concentrações e dois períodos de exposição para a avaliação da genotoxicidade pelo teste do cometa. Os resultados obtidos estão representados no gráfico 1B e mostram que doses não citotóxicas de ION-S (100 e 200 µg/mL) induzem um aumento significativo no número de quebras no ADN após 3 h e 24 h de exposição.

Gráfico 1: Toxicidade de ION-S na linha celular SHSY5Y. (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT (correlação de Spearman) e (B) dano genético avaliado pelo teste do cometa.



Em (B) as barras representam o erro padrão da média; * $P < 0.05$, diferença estatisticamente significativa relativamente ao controlo negativo, teste U de Mann-Whitney; % tDNA: percentagem de ADN na cauda; PC: controlo positivo

artigos breves_ n. 12

A análise da literatura científica relativamente ao potencial genotóxico das SPION (analisado pelo teste do cometa) revela resultados contraditórios (5). À semelhança do que descrevemos, alguns autores apresentam um aumento nos níveis de dano genético em células humanas após exposição a SPION (10, 11) mas a maioria das publicações aponta para resultados negativos (12-14). É importante referir que o teste do cometa deve ser validado para análise da genotoxicidade de cada tipo de nanopartícula antes de se efetuar o ensaio, de forma a excluir possíveis interferências que poderão enviesar os resultados (esta análise foi realizada no presente trabalho, tendo-se verificado que as ION-S não interferiam com a metodologia experimental do ensaio).

Conclusão

Os resultados aqui descritos sugerem que ION-S estudadas são biocompatíveis mesmo nas concentrações mais altas em estudo. No entanto, a análise da genotoxicidade mesmo a concentrações baixas mostra que estas nanopartículas são capazes de induzir dano genético nas células expostas.

Este dado vem reforçar a necessidade de uma análise exaustiva da toxicidade de SPION desenvolvidas para aplicações biomédicas. Futuros estudos devem incluir uma bateria de ensaios biológicos que ofereçam informação relativa aos mecanismos de toxicidade que estão na base dos efeitos aqui observados.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Xunta de Galicia (EM 2012/079) e pela Ação COST TD1204 MODENA. G. Kiliç foi apoiada por uma bolsa da Universidade da Coruña.

Referências bibliográficas:

- (1) Vasir JK, Labhasetwar V. Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4(4):363-74.
- (2) Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1252-65. [LINK](#)
- (3) Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia.* 2002;18(4):267-84.
- (4) Le Renard PE, Jordan O, Faes A, et al. The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials.* 2010;31(4):691-705.
- (5) Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen.* 2014 Sep 11. doi: 10.1002/em.21909. [Epub ahead of print]
- (6) Valdiglesias V, Costa C, Kiliç G, et al. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ Int.* 2013 May;55:92-100.
- (7) Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
- (8) Costa S, Coelho P, Costa C, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology.* 2008;252(1-3):40-8.
- (9) Boyer C, Bulmus V, Liu J, et al., The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater.* 2010; 2(1): 22-30. [LINK](#)
- (10) Magdolenova Z, Drlickova M, Henjum K, et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013 nov 14. [Epub ahead of print]
- (11) Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:17. [LINK](#)
- (12) Singh N, Jenkins GJ, Nelson BC, et al. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2012;33(1):163-70.
- (13) Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett.* 2009;188(2):112-8.
- (14) Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(9):1726-32.