

Avaliação integrada dos efeitos genotóxicos de nanomateriais manufacturados no ratinho transgénico *LacZ*

Henriqueta Louro¹, Ana Tavares¹, Nádia Vital¹, Pedro M Costa^{1,2},
Elsa Alverca³, João Lavinha¹, Maria João Silva¹

henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Instituto do Mar, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

(3) Departamento de Saúde Ambiental, INSA (à data).

Introdução

Os nanomateriais manufacturados (NMs), isto é, fabricados deliberadamente para fins específicos, apresentam propriedades físico-químicas únicas como a dimensão, área superficial ou funcionalização, que lhes conferem características mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas muito vantajosas para aplicações industriais e biomédicas. A título de exemplo, salienta-se a utilização crescente de NMs de dióxido de titânio em produtos de cosmética e higiene pessoal (1) (p.ex., em protetores solares e cremes). Contudo, a expansão da utilização destes e de outros NMs contrasta com a insuficiente avaliação de risco para a saúde humana e para o ambiente, sendo ainda considerados como um risco emergente para a saúde pública (2). Uma das principais preocupações relativamente aos efeitos adversos dos NMs é o seu potencial efeito cancerígeno para o Homem.

Num estudo recente, demonstrámos que um nanomaterial de dióxido de titânio na forma cristalina designada anatase, o NM-102 (do repositório do *Joint Research Center*; Ispra, Itália), induziu um aumento significativo de quebras cromossómicas - detetáveis na forma de micronúcleos - em linfócitos humanos expostos *ex vivo* (3) não se tendo, porém, observado um efeito dose-resposta.

Objetivo

No sentido de prosseguir e aprofundar a avaliação da genotoxicidade do NM-102, o presente estudo teve por objetivo caracterizar os seus efeitos genotóxicos, num modelo animal, utilizando uma

abordagem integrada, a qual abrangeu a análise de vários parâmetros de genotoxicidade no mesmo animal (4).

Materiais e métodos

Recorreu-se a um modelo de ratinho transgénico contendo o gene bacteriano *LacZ* inserido em plasmídeo (5). A exposição a NM-102 (10 e 15 mg/kg) realizou-se através de duas administrações sucessivas (com 24 h de intervalo) de cada dose por via intravenosa (i.v.). O desenho experimental combinou a análise integrada de vários parâmetros de genotoxicidade em diversos órgãos dos ratinhos, nomeadamente: anomalias cromossómicas (ensaio do micronúcleo) em reticulócitos de sangue periférico, quebras da cadeia de DNA (ensaio do cometa) e mutações no gene *LacZ* em células do baço e do fígado. Foram ainda efetuadas análises histológicas (microscopia óptica) e ultraestruturais (microscopia eletrónica de transmissão, TEM) de amostras de tecido hepático, com o intuito de demonstrar a ocorrência de exposição desses tecidos e células ao NM em estudo.

Resultados

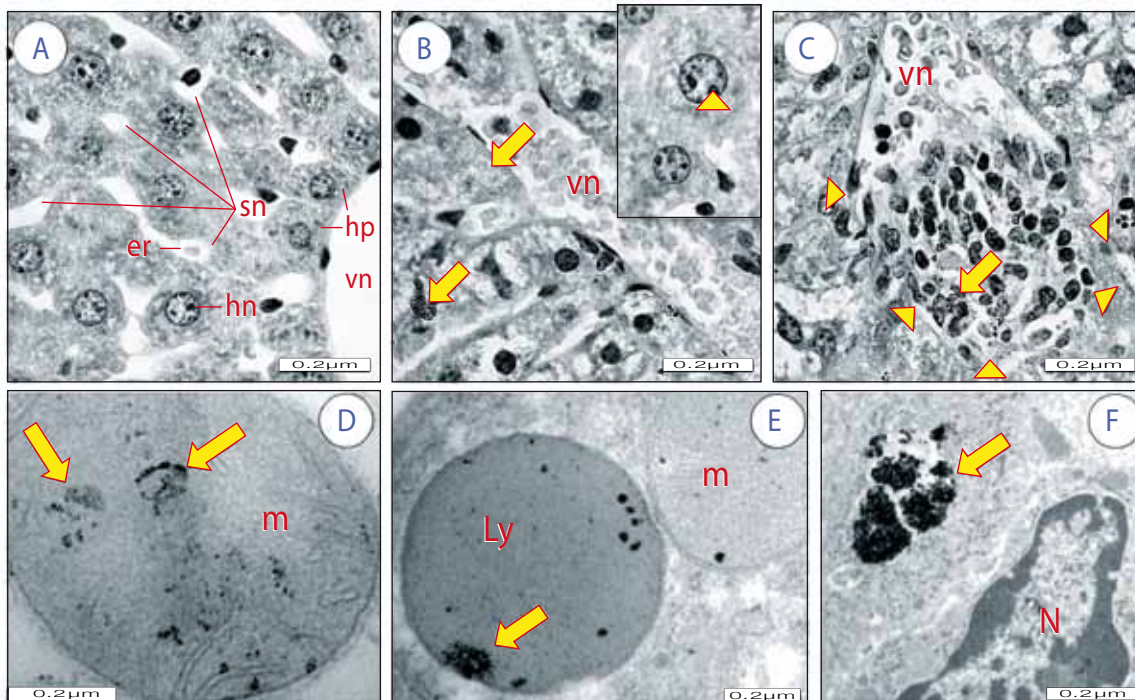
A análise histológica demonstrou, em amostras de tecidos dos animais tratados com a dose mais elevada de NM-102, uma acumulação de nanopartículas no fígado, bem como a presença de um processo inflamatório moderado (figura 1A-C).

A análise ultraestrutural (TEM) revelou a presença de depósitos eletrodensos, compatíveis com a acumulação de NMs no fígado dos animais expostos, independentemente da dose administrada (figura 1D-E).

Por sua vez, os resultados do ensaio do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico dos ratinhos não revelaram alterações cromossómicas significativas, 42 h após a segunda administração intravenosa (i.v.) de NM-102 (gráfico 1A).

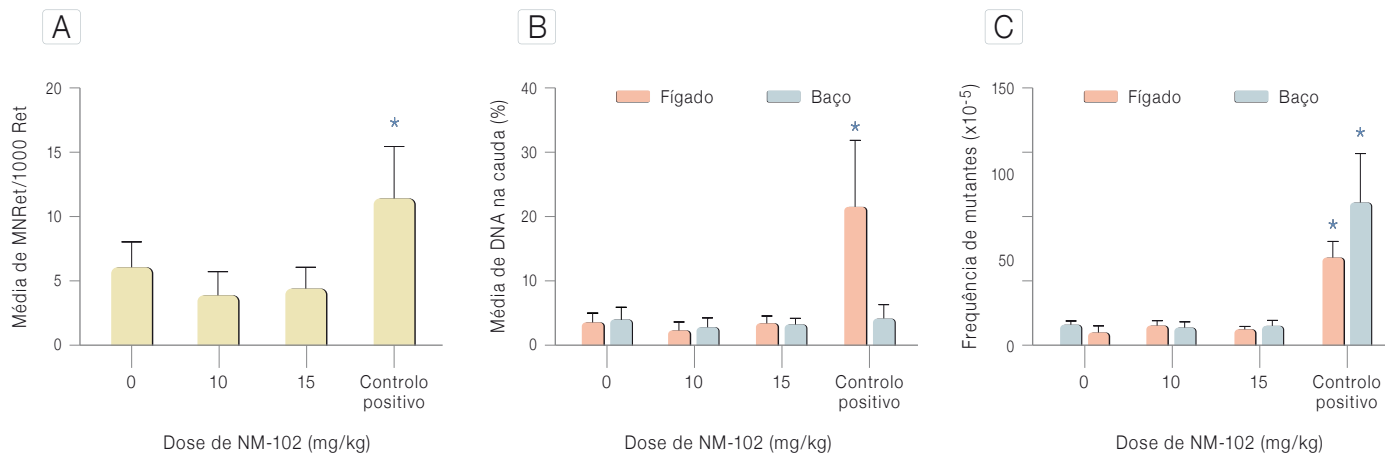
Decorridos 28 dias após a última administração, não se detetou qualquer aumento do nível de quebras de cadeia simples ou dupla de DNA (ensaio do cometa), tanto no fígado como no baço dos ratinhos expostos a 10 ou 15 mg/kg de NM-102 (gráfico 1B). Verificou-se também que não houve indução de mutações no gene *LacZ* nos mesmos órgãos dos ratinhos expostos (gráfico 1C).

Figura 1A-F: Microfotografias do fígado de ratinhos expostos a NMs.



(A) Controlo negativo com hepatócitos normais (hp). (B) Fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg de NM-102 exibindo aglomerados de nanomateriais no interior de hepatócitos (setas largas). (C) Fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg de NM-102 evidenciando aglomeração de células inflamatórias (entre setas), no interior das quais se podem encontrar aglomerados de nanomateriais (seta larga). Hn: núcleo hepatocítico; vn: vénula; er: eritrócitos. Escala: 25 μ m. (Créditos: Pedro M. Costa, IMAR e INSA). (D a F) Microfotografias de TEM mostrando depósitos de NMs no interior das estruturas celulares de hepatócitos de ratinhos expostos a NMs. m: mitocondria; LY: lisossoma. Escala: 0.2 μ m (Créditos: Elsa Alverca, INSA).

Gráfico 1A-C: Resultados dos ensaios de genotoxicidade em órgãos de ratinhos expostos a NM-102.



(A) Ensaio do micronúcleo em sangue periférico, 42 h após exposição; (B) Ensaio do cometa em células do baço e do fígado, 28 dias após exposição; (C) Ensaio de mutações no transgene *LacZ*, 28 dias após exposição; MNRet - reticulócitos micronucleados; Ret- reticulócitos.



Conclusões

A investigação da genotoxicidade do dióxido de titânio nanoparticulado - NM-102 - recorrendo a uma abordagem integrada num modelo de ratinho transgénico disponível no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, contribuiu para a evidência de que este nanomaterial não induz efeitos genotóxicos a nível sistémico, nas condições experimentais descritas. Salienta-se o facto de ter sido demonstrada a exposição interna e a acumulação do NM no fígado (4). Estes resultados negativos estão em concordância com os da maioria dos estudos publicados sobre a genotoxicidade de NMs de dióxido de titânio na forma cristalina anatase (6,7), embora estejam descritos também alguns resultados positivos para este tipo de NMs (8, 9).

Apesar dos resultados negativos dos estudos de genotoxicidade realizados, a observação de uma resposta inflamatória moderada em tecidos hepáticos sugere a possibilidade de ocorrência de genotoxicidade secundária *in vivo*, envolvendo inflamação. Reconhece-se que esta resposta tecidual leva à produção de espécies reativas de oxigénio que poderão conduzir, ainda que secundariamente, à formação de lesões no DNA, após exposição aos NMs. Assim, considerando a biopersistência do NM no organismo e o efeito inflamatório moderado observado, importa ainda investigar se ocorrerá genotoxicidade secundária, que venha a revelar-se apenas após uma exposição mais prolongada a estes nanomateriais. Para além deste aspeto, a inflamação observada sugere ainda que o eventual desenvolvimento de processos cancerígenos por mecanismos não genotóxicos deverá ser investigado futuramente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o contributo de Edwin Zwart, Wim H. de Jong (RIVM, Holanda) e Valerie Féssard (ANSES, França) para este trabalho.

Financiamento

Projeto co-financiado pela EU Grant Agreement 2009 21 01 (NANOGENOTOX), Health Programme e pelo INSA.

Artigo adaptado de: Louro H, Tavares A, Vital N, et al. Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 2014 Jul;55(6):500-9. <http://hdl.handle.net/10400.18/2362>

Referências bibliográficas:

- (1) Wijnhoven SWP, Dekkers S, Kooi M, et al. Nanomaterials in consumer products: update of products on the European market in 2010. Bilthoven: RIVM, 2011. (Report 340370003/2010) [LINK](#)
- (2) European Agency for Safety and Health at Work. Expert forecast on emerging chemical risks related to occupational safety and health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2009. (European risk observatory report, 2009). [LINK](#)
- (3) Tavares A, Louro H, Antunes, S, et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(1):60-9.
- (4) Louro H, Tavares A, Vital N, et al. Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55(6):500-9.
- (5) Louro H, Pinto M, Vital N, et al. The LacZ plasmid-based transgenic mouse model: an integrative approach to study the genotoxicity of nanomaterials. In: Sierra LM, Gaivão I (eds). *Genotoxicity and DNA repair: a practical approach.* New York: Humana Press-Springer, 2014. p. 451-77.
- (6) Sadiq R, Bhalli JA, Yan J, Woodruff RS, et al. Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutat Res.* 2012;745(1-2):65-72.
- (7) Naya M, Kobayashi N, Ema M, et al. *In vivo* genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;62(1):1-6.
- (8) Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat Res.* 2011;726(1):8-14.
- (9) Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, et al. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997;18(2):423-30.