

Nanomateriais Manufaturados

Avaliação de efeitos genotóxicos e implicações para saúde pública



Henriqueta Louro, Ana Tavares, Susana Antunes, Ana Margarida Vicente,
 Maria João Silva
 Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa
henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

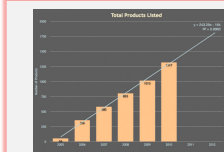
NANOMATERIAL MANUFATURADO

“material fabricado que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado... com uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 e 100 nanómetros.”

Fonte: Recomendação da Comissão Europeia, 18 Out 2011



Categorias de Produtos contendo NM:	Exemplos:
Biomedicina	Sistemas de "targeted drug-delivery", pele ou osso artificial para medicina regenerativa, sistemas de diagnóstico
Aparelhos	Frigoríficos, máquinas de lavar, ar condicionado, baterias
Electrónica e computação	Audio, vídeo, hardware, televisão, telemóveis
Mobiliário e produtos domésticos	Produtos de limpeza, utensílios de cozinha, joalheria, almofadas, tintas, materiais de construção
Veículos automóveis	Tinta, pneus, purificação do ar, limpeza do motor
Embalagens	Embalagens alimentares e sensores nas embalagens alimentares
Produtos de cuidado pessoal e cosmética	Protectores solares, champôs, cremes, desodorizante, pasta de dentes, maquiagem
Saúde	Ligaduras, aparelhos de audição, próteses ortopédicas
Desporto	Raquetes, tacos de golf, bolas de bowling
Têxteis	Roupa, lençóis



Crescente desenvolvimento, produção e utilização de nanomateriais manufaturados em produtos de consumo, nos últimos anos

Fonte: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/

NANOMATERIAIS

Risco emergente para a saúde humana?

- Algumas propriedades específicas dos NMs:
 - pequena dimensão
 - elevada razão área superficial/massa
 - possibilidade de revestimento com diversas moléculas
 contribuem para as suas vastas aplicações e para a expansão da sua utilização na indústria, produtos de consumo e biomedicina.
- Estas propriedades específicas dos NMs podem ter como consequência uma maior toxicidade e reatividade nos sistemas biológicos do que os seus análogos de tamanho normal.
- Considerando o paradigma de análise de risco (*risk analysis*) convencional, tem surgido a dúvida sobre a sua aplicabilidade ao caso dos NMs, devido às suas propriedades intrínsecas.
- A Nanotoxicologia pretende gerar evidência científica sobre potenciais efeitos adversos dos NMs, no organismo humano e ecossistemas, levando em consideração as especificidades dos NMs.

Fonte: SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS, 2009; OBERDÖRSTER, 2010

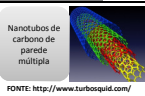
Objectivos

Contribuir para a avaliação de risco através da caracterização dos potenciais efeitos genéticos (genotoxicidade) associados à exposição a uma classe de NMs, os nanotubos de carbono de parede múltipla (NM402 e NM403).

Metodologia

Nanomateriais em estudo – informação dos fornecedores

	NM402	NM403
Fase Cristalina	Nanotubos de carbono	Nanotubos de carbono
Tamanho (nm)	100-10 000	100-10 000
Comprimento (nm)	1500	Sem informação
Diâmetro (nm)	11	Sem informação
Área Superficial [m ² /g]	250	Sem informação
Impurezas	<10 peso %	Sem informação
Utilização	Compositos e aplicações na área da energia	



Fonte: JRC repository

• Para a dispersão destes NMs insolúveis, foi utilizado o protocolo desenvolvido na Acção Concertada Nanogenotox (Jensen et al., 2011), de modo a evitar a agregação/aglomeração dos NMs no meio de cultura.



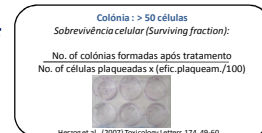
A549- linha celular de adenocarcinoma pulmonar



Avaliação da Citotoxicidade:

Ensaio Clonogénico

Células A549 expostas aos NMs por 8 dias

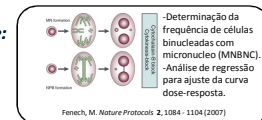


• O ensaio clonogénico, ou ensaio de formação de colónias, permite detetar a toxicidade celular induzida por um agente através da quantificação da capacidade de uma célula formar uma colónia. Assim, pode ser usado como um indicador da sobrevivência celular após a exposição.

Avaliação de Genotoxicidade:

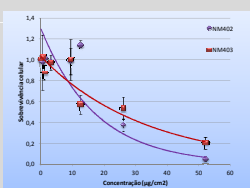
Ensaio do Micronúcleo

Células A549 expostas aos NMs por 48h.



• O ensaio do micronúcleo permite a deteção de danos nos cromossomas, sejam acontecimentos aneuploídicos (perda de cromossomas) ou clastogénicos (quebras cromossómicas). Esta metodologia fornece ainda informação sobre a progressão do ciclo celular e citotoxicidade.

Resultados

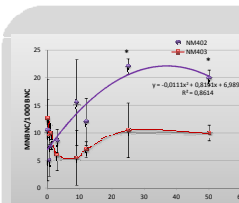


Observou-se uma relação dose-resposta, modelo exponencial ($R^2 = 0,909$ e $0,931$).

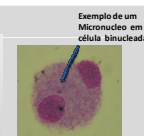


Imagem exemplificativa: aumentando a dose de NM, a capacidade de formar colónias diminui.
 IC_{50} NM402 = 19,03 μ g/cm²
 IC_{50} NM403 = 24,03 μ g/cm²

• Os resultados do ensaio clonogénico mostraram que ambos os NMs são citotóxicos pois induziram um decréscimo da sobrevivência celular dependente da dose.



* Significativamente diferente dos controlos ($P < 0,02$, teste exacto de Fisher).



Exemplo de um Micronúcleo em célula binucleada

• As concentrações mais elevadas de NM402 induziram um aumento de 2 vezes na frequência de micronúcleos, em relação ao controlo.
 • A análise de regressão indicou uma relação dose-resposta, apenas para o NM402.
 • Para o NM403 não se verificou dose-resposta.

Conclusões

Ambos os NMs demonstraram efeitos citotóxicos nas células A549, mas a capacidade de induzirem danos genéticos revelou-se distinta. As diferenças encontradas podem ser devidas, por exemplo, às diferentes dimensões de cada NM ou às impurezas presentes em cada um deles. No contexto da avaliação de risco dos NMs, torna-se crucial a investigação das curvas dose-resposta de cada NM individual e a exploração dos efeitos ao nível celular, recorrendo a NMs bem caracterizados.

Perante a crescente exposição humana a nanomateriais, o contributo da Nanotoxicologia é fundamental para fornecer a base de conhecimento para a avaliação de risco, e deste modo, garantir a utilização segura dos NMs, salvaguardando a Saúde Pública.