

## Efeitos tóxicos dos nanotubos de carbono em células do trato respiratório humano

### Toxicological effects of carbon nanotubes in human respiratory cells

Henriqueta Louro<sup>1,3</sup>, Mariana Pinhão<sup>1,3</sup>, Joana Santos<sup>1,3</sup>, Ana Tavares<sup>1</sup>, Nádia Vital<sup>1,3,4</sup>, Célia Ventura<sup>1,2</sup>, Maria João Silva<sup>1,3</sup>

henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(3) PToNANO, Lisboa, Portugal.

(4) Instituto de Soldadura e Qualidade, Taguspark, Oeiras, Portugal.

#### \_Resumo

Os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCs) são nanomateriais (NM) frequentemente utilizados como compósitos estruturais, em aplicações energéticas e em eletrónica. Com o objetivo de contribuir para a avaliação da sua segurança para o homem, foi investigada a toxicidade de vários NTC (NM-400, NM-401, NM-402 e NM-403) considerando a relação entre as suas propriedades físico-químicas e toxicológicas. Os efeitos citotóxicos foram analisados através do ensaio clonogénico e do índice replicativo, enquanto a genotoxicidade foi avaliada através dos ensaios do cometa e do micronúcleo, em duas linhas celulares do trato respiratório humano, as células A549 e Beas-2B. A exposição das células durante 48h revelou que apenas o NM-401 era citotóxico em ambos os tipos de células, mas, após uma exposição de 8 dias, todos os NTCs eram citotóxicos nas células A549. A análise de correlação sugeriu uma associação entre a dimensão dos NTCs no meio de cultura e a sua citotoxicidade. O ensaio do cometa não revelou indução de quebras na molécula de DNA. Contudo, os NM-401 e NM-402 induziram a formação de micronúcleos em A549, mas não em Beas-2B. Como estes são os NTCs mais longos, o comprimento parece ser um fator determinante para a genotoxicidade.

#### \_Abstract

Multi-walled carbon nanotubes (CNTs) are nanomaterials (NMs) frequently used in applications such as structural composites, energy applications and electronics. To contribute to the safety assessment of CNTs, this work investigated the toxicological effects of CNTs (NM-400, NM-401, NM-402 and NM-403), in relation to their physicochemical characteristics. The cytotoxic effects were analysed using the clonogenic assay and replication index, while genotoxic effects were evaluated by the comet and micronucleus assays, in two types of human respiratory cells, A549 and Beas-2B. The 48h-exposure of cells revealed that only NM-401 was cytotoxic in both cell lines, but after 8-days exposure, all the tested CNTs were cytotoxic in A549 cells. Correlation analysis suggested an association between the CNTs' size in cell medium and cytotoxicity. Using the comet assay, no induction of DNA damage was observed. However, NM-401 and NM-402 induced micronucleus in A549 cells but not in Beas-2B. NM-401 and NM-402 are the two longest MWCNTs analyzed in this work and therefore length of the CNT may be determinant for genotoxicity. The different CNTs effect in the two cell lines is explained in view of the size-distribution of MWCNTs in the cell medium, rather than cell's specificities.

#### \_Introdução

A pequena dimensão dos materiais quando produzidos à escala nanométrica (<100 nm) confere-lhes propriedades físicas, químicas e biológicas que podem diferir bastante das propriedades dos materiais com a mesma composição química, mas utilizados numa escala não nanométrica. As propriedades mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas inerentes aos nanomateriais tornam-nos vantajosos para as mais diversas aplicações industriais e biomédicas (1). Efetivamente, a tecnologia baseada nos nanomateriais, ou nanotecnologia, foi identificada como uma *key enabling technology*, impulsionadora do crescimento económico dos países industrializados, devido ao seu potencial para melhorar a qualidade e desempenho de muitos tipos de produtos e de processos. Contudo, a expansão da sua utilização contrasta com a insuficiente avaliação de risco para a saúde humana e para o ambiente, sendo considerados como um risco potencial para a saúde pública. Uma das principais preocupações relativamente aos efeitos adversos na saúde humana é o seu potencial efeito carcinogénico, que é sugerido por alguns estudos experimentais, como é o caso dos nanotubos de carbono (NTCs). Recentemente, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) avaliou um tipo de NTC, MWCNT-7, como sendo possivelmente carcinogénico para o ser humano (Grupo 2B (2)) enquanto os restantes NTC foram considerados não classificáveis (Group 3 (2)). Esta classificação reflete os resultados contraditórios descritos na literatura relativamente à toxicidade dos NTC.

Procurando contribuir para a avaliação de seguranças dos NTCs, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de um grupo de NTCs, em duas linhas celulares do trato respiratório humano (3). Em simultâ-

neo foi investigado o impacto das várias propriedades físico-químicas dos NTCs na sua toxicidade, no sentido de possibilitar o desenvolvimento de nanomateriais mais seguros.

### **\_Materiais e métodos**

Recorrendo a quatro NTCs de referência, previamente caracterizados (NM-400, NM-401, NM-402 e NM-403 (4)), foram preparadas dispersões destes NTCs de acordo com um protocolo padronizado (5). A dimensão média dos NTCs, na dispersão inicial e quando diluídos no meio de cultura foi analisada através de *dynamic light scattering* (DLS).

Uma vez que a via de exposição humana mais provável é a via inalatória, como modelo celular foram utilizadas células alveolares (A549) e células epiteliais brônquicas (Beas-2B), que foram expostas a várias concentrações destes NTCs. A citotoxicidade foi analisada através do índice replicativo das células após 48h de exposição e pela sua capacidade de formar colónias (ensaio clonogénico) após 8 dias de exposição. Para caracterização da genotoxicidade dos NTCs utilizou-se o ensaio do micronúcleo (deteção de quebras ou perda cromossómica) após 48h de exposição e o ensaio do cometa (deteção de quebras no DNA), após 24h de exposição.

### **\_Resultados e discussão**

A análise da dispersão de cada um dos NTCs (DLS) revelou que se obtiveram dispersões homogéneas para todos e, quando estas foram diluídas no meio de cultura das células A549, verificou-se um ligeiro aumento das dimensões médias, embora ainda fossem observáveis partículas manométricas. No entanto, para o meio de cultura das células Beas-2B, as dimensões das partículas passaram a ser muito superiores e o índice de polidispersibilidade muito elevado, consistente com uma distribuição multimodal (3).

Os resultados mostraram que apenas o NM-401 apresentou efeitos citotóxicos em ambas as linhas celulares após 48h de exposição, mas todos os NTCs reduziram drasticamente a viabilidade das células A549 expostas por 8 dias (gráfico 1A), permitindo o cálculo da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) de

cada um. A análise de correlação sugeriu uma associação entre a dimensão média dos NTCs no meio de cultura e o seu IC<sub>50</sub> (gráfico 1B).

Relativamente à genotoxicidade dos NTCs, não se verificou, em nenhuma das linhas celulares, qualquer indução de quebras de cadeia simples ou dupla no DNA após uma exposição de 24h. Já no que diz respeito ao ensaio do micronúcleo, apesar de não se terem detetado efeitos nas células Beas-2B (gráfico 2A) observou-se um aumento da frequência de micronúcleos nas células A549 após 48h de exposição aos NM-401 e NM-402, indicando a indução de instabilidade cromossómica (gráfico 2B) (3).

Considerando a relação entre a toxicidade e as propriedades físico-químicas primárias dos vários NTCs, verifica-se que o NM-401 e NM-402 apresentam o maior comprimento, pelo que se sugere que esta característica é determinante da genotoxicidade. Porém, como nas células Beas-2B não houve indução de genotoxicidade, outros fatores deverão ser também considerados, nomeadamente a dimensão distinta que os NTCs adquiriram após a sua dispersão no meio de cada linha celular e que se revelou determinante para a citotoxicidade.

Gráfico 1: ↓ Redução da viabilidade celular em células A549 expostas durante 8 dias a NTCs (A) e sua correlação com a dimensão média dos NTCs dispersos no meio de cultura (B).

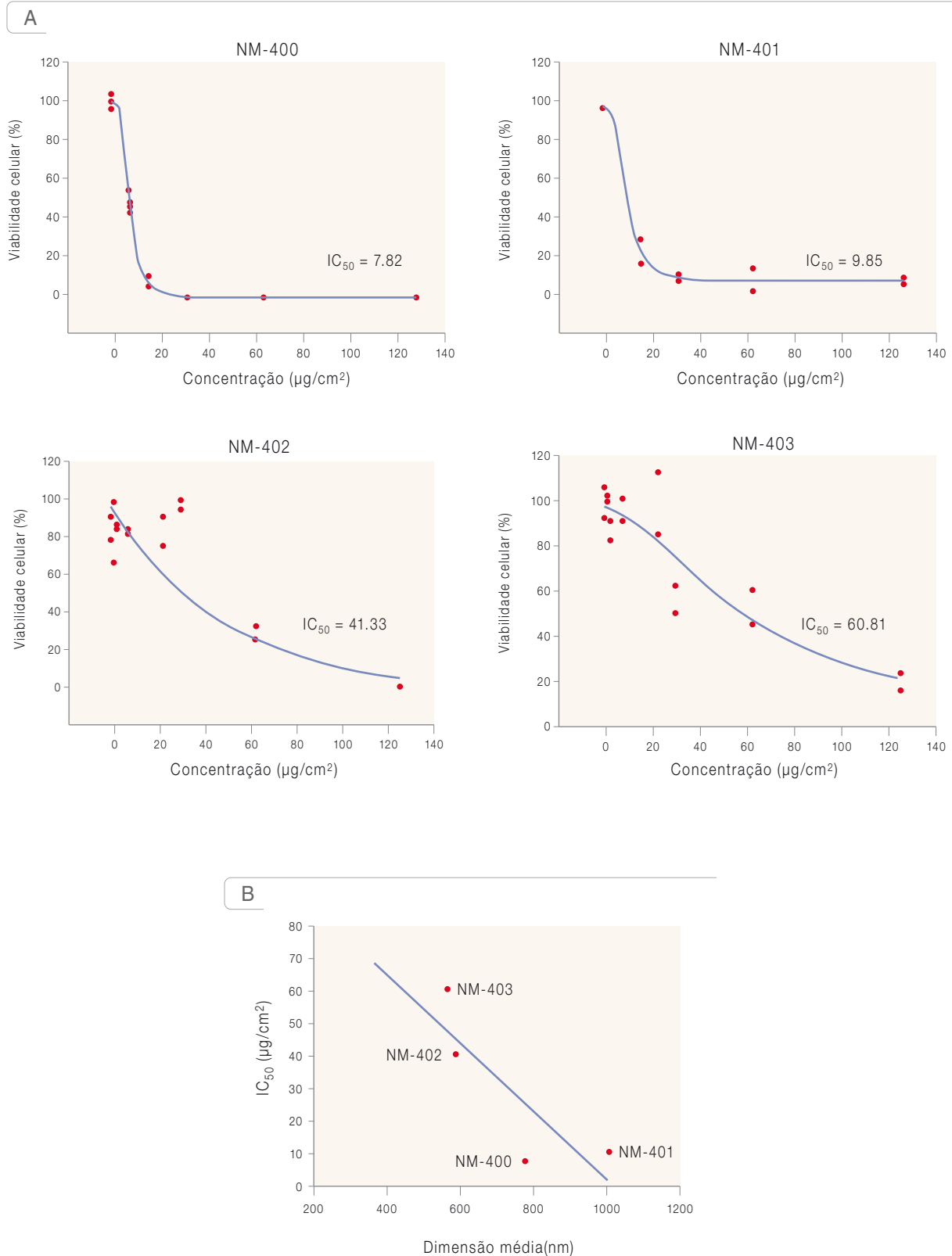
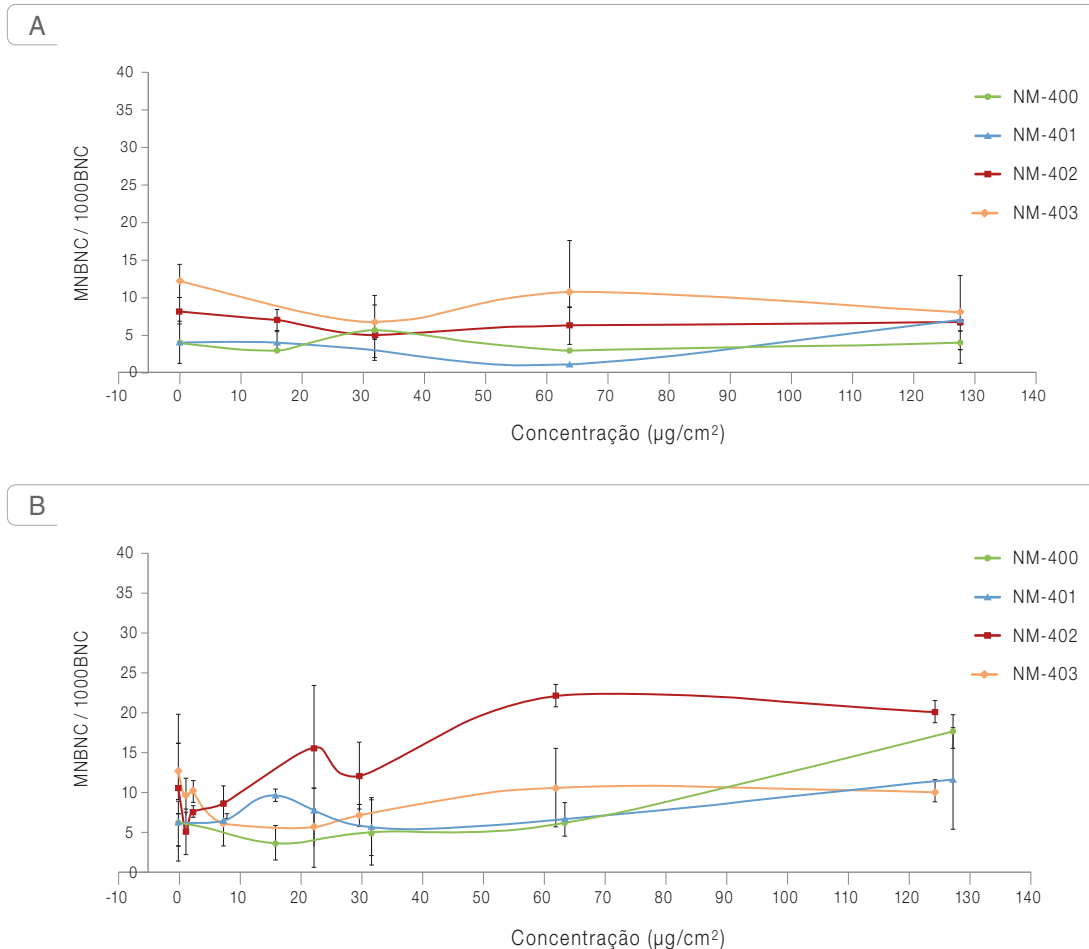


Gráfico 2: Resultados do ensaio do micronúcleo em células (A) Beas-2B e (B) A549.



MNBN- células binucleadas micronucleadas; BNC- células binucleadas.

## Conclusão

Neste estudo concluiu-se que algumas formas de NTCs, designadamente os mais longos, produzem efeitos genotóxicos em células humanas. Perante a incerteza dos níveis de exposição real do organismo humano e das concentrações atingidas nos vários domínios do ambiente, a segurança da utilização dos NTCs não pode ser, por enquanto, garantida. Assim, e tendo em conta a elevada produção e a crescente utilização destes nanomateriais, são prementes futuros estudos de monitorização ambiental e humana.

## Agradecimentos

Trabalho cofinanciado pelo Projetos FP7 NANoREG (GA 310584), pela Ação Concertada NANOGENOTOX (GA 2009 21) e pelo INSA (2013DGH860).

## Referências bibliográficas:

- (1) Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015 ;6:1769-80. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578396/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578396/)
- (2) Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, et al.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1427-8.
- (3) Louro H, Pinhão M, Santos J, et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicol Lett.* 2016;262:123-34.
- (4) Rasmussen K, Mast J; De Temmerman P-J, et al. Multi-walled Carbon Nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403: characterisation and physico-chemical properties: JRC Repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC91205>.
- (5) Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al. The generic NANOGENOTOX dispersion protocol. Standard Operation Procedure (SOP) and background documentation. Copenhagen: National Research Centre for the Working Environment, 2011. [www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox\\_deliverable\\_5.pdf](http://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable_5.pdf)