

ESTUDO COMPARATIVO DA TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE INDUZIDAS POR DIFERENTES NANOTUBOS DE CARBONO *IN VIVO*

Laise Rodrigues de ANDRADE e Kênya Silva CUNHA. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. kenya@icb.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: nanotubos, *Drosophila*, DNA

INTRODUÇÃO

Os avanços em nanotecnologia levaram ao desenvolvimento de um novo campo de pesquisa, a nanomedicina, que visa estudar a aplicação de nanomateriais em diagnósticos e terapias de algumas condições patológicas (Shvedova et al., 2009). Nesse contexto, as nanopartículas de carbono, devido a extraordinárias propriedades físico-químicas e elétricas, têm emergido como uma nova opção para possível uso em metodologias no tratamento de câncer, na bioengenharia e terapia gênica (Firme III e Bandaru, 2010).

As nanopartículas de carbono foram descobertas por Iijima em 1991 como um dos alótropos do carbono elementar. Neste estado, o carbono ocorre como pequenos cilindros ocos com diâmetros na faixa de 0,4 a 2,5 nm e comprimento de 10 a 100 μm . Devido a sua morfologia tubular com dimensões nanométricas foram chamadas “nanotubos de carbono”. Com base nas suas estruturas, os nanotubos de carbono (NTCs) podem ser divididos em duas categorias: (i) nanotubos de parede única ou simples (SWCNT, do inglês *single-wall carbon nanotubes*) que são constituídos apenas por uma camada cilíndrica de grafeno formada exclusivamente por átomos de carbono arranjados em estrutura de anéis hexagonais fundidos, e (ii) nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-walls carbon nanotubes*), constituídos de vários cilindros concêntricos de grafeno, onde um cilindro de menor diâmetro é envolvido por outro cilindro de maior diâmetro e permanecem espaçados 0,34-0,36 nm um do outro e unidos por interação de van der Waals (Herbst, 2004).

Devido a diversidade de aplicações, reais ou potenciais, dos NTCs, assim como o impacto que os resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico, a nanotecnologia atrai investimentos que ultrapassam milhões de dólares por ano em todo mundo (Nanosafe, 2010), bem como o interesse de

inúmeros grupos de pesquisa. Dados recentes têm mostrado que o investimento do mercado global em NTCs está previsto atingir US\$2 bilhões, considerando-se que uma tonelada de NTCs está sendo produzida em todo mundo a cada ano (Yamashita et al., 2010).

No entanto, procedimentos utilizados na manipulação de NTCs podem resultar na liberação de aerossóis destes materiais no ambiente, aumentando o risco de exposição humana a estes nanomateriais através de inalação, ingestão e penetração cutânea (Kisin et al., 2007). Diante desse cenário e frente à possibilidade de aplicação dos NTCs na medicina e nos mais variados setores industriais, a compreensão do efeito destes novos nanomateriais sobre o meio ambiente e na saúde humana torna-se uma prioridade nas investigações. Neste estudo, foram analisados e comparados a toxicidade potencial e a capacidade para induzir danos no DNA de dois diferentes nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT): (i) NTC (Corea Co), um MWCNT coreano vendido comercialmente (ii) NT, um MWCNT sintetizado no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (UNICAMP).

MATERIAL E MÉTODO

Foi empregado o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* que detecta a perda de heterozigose de dois marcadores genéticos envolvidos na via metabólica de formação de pêlos das asas – pêlos múltiplos (*mwh*) e flare³ (*flr³*). A ocorrência de danos ao DNA, incluindo mutações pontuais e cromossômicas e recombinação mitótica, são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que dividem mitoticamente dando origem às asas das moscas adultas, com pêlos apresentando fenótipos mutantes (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2004).

Larvas de terceiro estágio, obtidas do cruzamento padrão, entre fêmeas *flr³* e machos *mwh*, foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio de purê de batata e 3 mL das soluções de tratamento com diferentes concentrações de NTC (Corea Co) e NT. As larvas permaneceram em tratamento até atingirem o estágio de pupa. Os adultos nascidos 10-12 dias após a postura de ovos foram conservados em etanol 70% para posterior montagem das lâminas das asas das moscas *mwh/flr³* e análise microscópica dos tricomas para a identificação de anormalidades fenotípicas.

A avaliação da toxicidade genética foi feita através da comparação entre a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados e o controle negativo. O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei e Würigler (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um experimento piloto, a toxicidade crônica de ambos compostos, NTC (Corea Co) e NT, foi determinada quantitativamente para determinar a faixa de concentração utilizada nas análises de toxicidade genética. Para isso, grupos de 100 larvas foram tratados por 48 h com diferentes concentrações de cada composto. Todas as concentrações permitiram uma taxa de sobrevivência superior a 90%, indicando ausência de toxicidade dos MWCNTs e, portanto, foram aplicadas para realizar a avaliação da toxicidade genética destes compostos. Utilizando o teste binomial condicional, os resultados dos diferentes tratamentos com NTC (Corea Co) e NT foram comparados com o respectivo controle negativo (água destilada), demonstrando que não houve aumento significativo nas frequências de mutação e recombinação ($p < 0,05$), considerando o total de manchas presentes no genótipo *mwh/flr³*. Os resultados negativos indicam que os dois MWCNTs testados não induzem alterações no DNA em células somáticas de *D. melanogaster* relacionadas com mutação e/ou recombinação.

Alguns estudos sobre nanopartículas foram realizados utilizando a *D. melanogaster* como organismo experimental (Leeuw et al, 2007; Liu et al., 2009; Yadav et al., 2010), embora nenhum deles abordaram os possíveis efeitos sobre o material genético celular. Em 2007, Leeuw et al. capturaram as primeiras imagens ópticas de nanotubos de paredes simples (SWCNTs) no interior da *D. melanogaster* utilizando uma técnica inédita, desenvolvida para obtenção de imagens fluorescentes em comprimentos de onda próximos ao infravermelho. Larvas foram cultivadas em uma pasta de levedura que continha 9 ppm de SWCNTs dispersos, e permaneceram em tratamento até se tornarem pupa. As moscas sobreviveram até a fase adulta da mesma forma que as do grupo controle, indicando ausência de toxicidade, corroborando os resultados obtidos no presente estudo. Posteriormente, os tecidos das moscas foram removidos e examinados para verificar os exatos

pontos em que estavam concentrados os nanotubos. A maior quantidade de NTCs foi encontrada no vaso dorsal, que é análogo a um vaso sanguíneo principal em mamíferos, enquanto que menores quantidades foram encontradas nas glândulas salivares, túbulos de Malpighi, cérebro, discos imaginais, traquéia e nos tecidos de gordura. Foi estimado que, em média, apenas 1 a cada 100 milhões de nanotubos ingeridos, atravessam a parede intestinal e se tornam incorporados nos tecidos, a maioria é excretada. Portanto, a ausência de toxicidade pode resultar da baixa biodisponibilidade de MWCNTs nos órgãos e tecidos internos da mosca-da-fruta, mesmo estendendo a concentração para 1000 µg/mL (~ 1100 ppm).

A ausência de toxicidade genética observada no teste SMART pode refletir a pequena quantidade de MWCNTs que penetraram no núcleo das células discos imaginais, pois a presença dos nanomateriais neste grupo de células provavelmente representa a captação secundária após a entrada dos mesmos na hemolinfa circulante - um equivalente de sangue em humanos (Leeuw et al, 2007; Yadav et al, 2010). Além disso, MWCNTs com alto grau de pureza, como o NT sintetizado no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng/UNICAMP), promove uma menor geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuindo o risco de danos ao DNA, o que também pode explicar a ausência de toxicidade neste estudo *in vivo*.

CONCLUSÕES

Os resultados negativos obtidos no teste SMART mostram que os dois MWCNTs avaliados não são tóxicos e não induzem danos ao DNA. No entanto, outras investigações *in vivo* devem ser realizadas antes de qualquer aplicação clínica e/ou industrial dos MWCNTs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. **Methods in Molecular Biology**, v.247, p.389-409 (2004).

- FIRME III, C.P. E BANDARU, P.R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p.245–256 (2010).
- FREI, H. e WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.297-308 (1988).
- GRAF, U.; WURGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188 (1984).
- HERBST, M.H. Technology of carbon nanotubes: trends and perspectives of a multidisciplinary area. **Quimica Nova**, v.27, n.6, p.986-992 (2004).
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, p.56-58 (1991).
- KASTENBAUM, M.A. e BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v.9, p.527–549 (1970).
- KISIN, E.R., *et al.* Single-walled carbon nanotubes: geno-and cytotoxic effects in lung fibroblast v79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.70, p.2071–2079 (2007).
- LEEUW, T.K., *et al.* Single-Walled Carbon Nanotubes in the Intact Organism: Near-IR Imaging and Biocompatibility Studies in *Drosophila*. **Nano Letters**, v. 7, n. 9, p. 2650-2654 (2007).
- LIU, X., *et al.* Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in *Drosophila*: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. **Environmental Science & Technology**, v.43, p. 6357–6363 (2009).
- NANOSAFE. Safe production and use of nanomaterials. Disponível em: <<http://www.nanosafe.org>> [Acessado 23/08/2010].
- SHVEDOVA, A.A., *et al.* Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? **Pharmacology & Therapeutics**, v.121, p.192–204 (2009).
- YADAV, J.S., *et al.* 4-*N*-pyridin-2-yl-benzamide nanotubes compatible with mouse stem cell and oral delivery in *Drosophila*. **Nanotechnology** 21 (2010) 155102 (9pp).
- YAMASHITA, K., *et al.* Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. **Inflammation**, v.33, n.4, p.276-280 (2010).