

Caracterização da genotoxicidade de nanomateriais manufaturados e potencial impacto na saúde humana

Henriqueta Louro, Ana Tavares, Susana Antunes, Nádya Vital, João Lavinha, Maria João Silva

Unidade de Investigação e Desenvolvimento.
Departamento de Genética Humana, INSA.

Introdução

Os nanomateriais manufaturados (NMs), isto é, materiais fabricados que contêm partículas em que uma ou mais dimensões externas se situam na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nanómetro e 100 nanómetros⁽¹⁾ apresentam propriedades físico-químicas únicas (e.g., dimensão, área superficial, funcionalização) que lhes conferem características mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas muito vantajosas, relativamente aos mesmos materiais na forma não nanométrica⁽²⁾. Assim, tem-se assistido a um incremento significativo no desenvolvimento, produção e utilização de nanomateriais manufaturados a nível mundial e a uma rápida progressão das nanotecnologias como promotoras de inovação em termos de aplicações e produtos, nomeadamente, nas áreas da ciência, biomedicina e produtos de consumo⁽³⁾.

O desenvolvimento exponencial das nanotecnologias contrasta com a avaliação ainda insuficiente dos eventuais perigos associados aos nanomateriais, designadamente ao nível dos potenciais efeitos lesivos do genoma e suas consequências a longo termo na saúde humana e no ambiente. Neste contexto, a nanotoxicologia poderá dar um contributo inestimável, em particular, no que se refere aos efeitos genotóxicos e potencialmente tumorigénicos dos NMs⁽²⁾.

O caso dos nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCs) é um exemplo das incertezas que subsistem na avaliação de segurança dos nanomateriais. A sua semelhança, em tamanho e forma, com as fibras de amianto tem conduzido a grandes preocupações sobre seus potenciais efeitos carcinogénicos. Contudo, devido à complexidade inerente às suas propriedades físico-químicas, a caracterização da genotoxicidade destes materiais tem produzido resultados contraditórios e difíceis de interpretar^(4,5). Assim, a comparação dos resultados dos diversos estudos constitui um desafio tanto para os cientistas como para os legisladores.

Procurando responder a algumas destas necessidades de conhecimento, iniciou-se em 2010 a Acção Concertada Europeia "NANOGENOTOX- Safety Evaluation of Manufactured Nanomaterials by Characterisation of their Potential Genotoxic Hazard", na qual o INSA tem participado. No âmbito desse projeto, o presente trabalho teve como objetivo específico comparar os potenciais efeitos genotóxicos de vários NTCs em culturas primárias de linfócitos humanos.

Materiais e Métodos

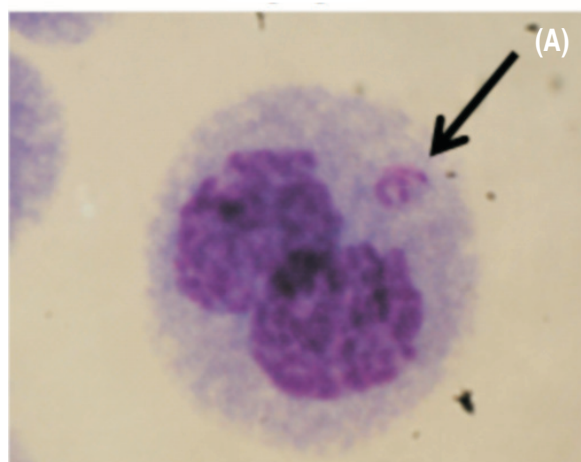
Foram preparadas dispersões de quatro NTCs (NM-402, NM-403, NRCWE-006 e NRCWE-007) previamente caracterizados, de acordo com um protocolo padronizado⁽⁶⁾ e expuseram-se os linfócitos em cultura a várias concentrações destes NMs entre 0 e 250 µg/ml, incluindo também controlos positivos. O ensaio do micronúcleo *in vitro*, um método validado e aceite para efeitos de regulação, foi selecionado para avaliar a instabilidade cromossómica *in vitro*⁽⁷⁾.

Resultados

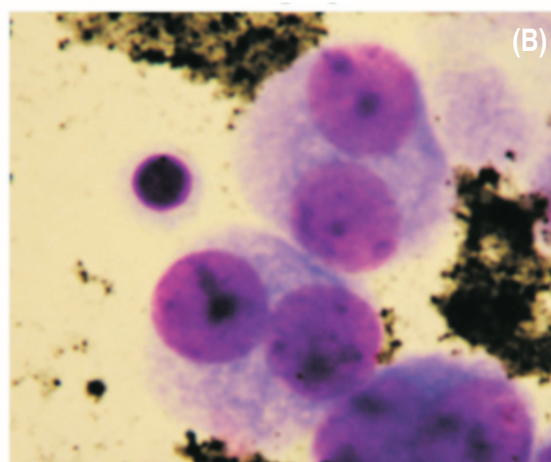
A Figura 1 ilustra o ensaio do micronúcleo num linfócito humano após bloqueio da citocinese (linfócito binucleado), mostrando um micronúcleo no citoplasma da célula, indicador da ocorrência de um evento de quebra ou perda cromossómica. O comportamento dinâmico dos NTCs,

→ continua

Figura 1: Microfotografias do ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos.



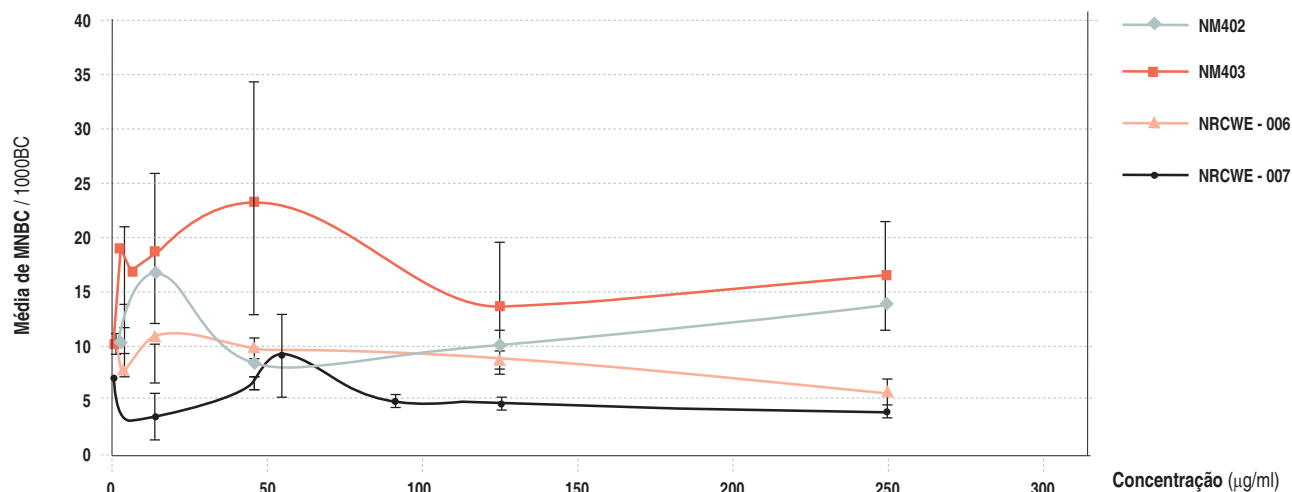
(A) Visualização de um micronúcleo (seta) em célula binucleada.



(B) Aspeto dos aglomerados de NTCs após exposição dos linfócitos à concentração mais elevada (250 µg/ml).

artigos breves_ n. 8

Gráfico 1: ↓ *Frequência de células binucleadas micronucleadas (MNBC) por 1000 células binucleadas (BC) após exposição in vitro dos linfócitos humanos a quatro nanotubos de carbono.*



ou seja, a sua capacidade de formação de agregados ou aglomerados, é visível sobretudo nas concentrações mais elevadas (B).

_Verificou-se um aumento significativo da frequência de micronúcleos (Gráfico 1) em linfócitos humanos expostos a 15 µg/ml do NM-402 ($p = 0,015$, teste exato de Fisher), 2,5 e 15 µg/ml de NRCWE-006 ($p = 0,007$ e $0,009$) e a todas as doses (exceto 125 µg/ml) do NM-403 ($p < 0,018$). No entanto, não foi observado um efeito dose-resposta com base na frequência de linfócitos micronucleados. Relativamente ao NRCWE-007, não se observaram efeitos genotóxico em linfócitos. Ambos os controlos positivos, nanopartículas de óxido de zinco e mitomicina C, produziram um incremento estatisticamente significativo da frequência de linfócitos micronucleados.

Conclusões

No estudo apresentado, foi avaliada a genotoxicidade de nanotubos de carbono, cujas propriedades físico-químicas foram previamente caracterizadas por outros parceiros do projeto, evidenciando diferenças no que diz respeito à sua dimensão, razão altura/largura e área superficial (resultados não apresentados).

_Através do ensaio do micronúcleo, verificámos que o potencial genotóxico destes quatro nanomateriais é distinto, sendo que alguns foram capazes de induzir instabilidade cromossómica (NM-403 e NRCWE-006), ao passo que outros produziram resultados equívocos (NM-402, apenas positivo para uma dose) ou negativos (NRCWE-007). Estas diferenças decorrem, possivelmente, das propriedades intrínsecas distintas dos quatro NTCs que implicam também diferenças na internalização pela célula e nos seus efeitos intracelulares (8).

_Assim, no contexto da avaliação da segurança dos NMs, torna-se crucial a investigação das curvas dose-resposta de cada NM individualmente e dos efeitos e mecanismos ao nível celular, recorrendo a NMs bem caracterizados. Apenas deste modo poderão ser preenchidas as lacunas de conhecimento acerca da toxicidade dos NMs e ser estabelecida uma evidência alicerçada numa base de conhecimento científico sólido, para garantir a saúde pública perante a crescente exposição humana a nanomateriais.

Financiamento

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

Referências bibliográficas:

- (1) European Commission. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Official Journal of the European Union 2011;L 275/38.
- (2) Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. J Intern Med. 2010 Jan;267(1):89-105.
- (3) Wijnhoven, SWP, Dekkers S, Kooi, M. et al. Nanomaterials in consumer products- Update of products on the European market in 2010. The Netherlands: RIVM, 2010.
- (4) Szendi, K, Varga C. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. Anticancer Res. 2008;28(1A):349-52.
- (5) Cveticanin J, Joksic G, Leskovic A, et al. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. Nanotechnology. 2010;21(1):015102.
- (6) Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al. The generic NANOGENOTOX dispersion protocol- Standard Operation Procedure (SOP). NANOGENOTOX, 2011.
- (7) OECD Guideline for the testing of chemicals, Section 4 (Health Effects) - Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2010.
- (8) Lindberg HK, Falck GC, Suhonen S, et al. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. Toxicol Lett. 2009;186(3):166-73.