



## GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE NÍQUEL

Karol Ferreira Honatel<sup>1</sup>  
Débora dos Santos Chaves<sup>2</sup>  
Tatiane RochaCardozo<sup>3</sup>  
Raíne Fogliati de Carli<sup>4</sup>  
Allan Seeber<sup>5</sup>  
Wladimir Hernandez Flores<sup>6</sup>  
Mauricio Lehmann<sup>7</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>8</sup>

### Resumo

A inalação de compostos de níquel é um perigo que está associado com o desenvolvimento de inflamação pulmonar, fibrose e câncer. No entanto, os mecanismos de toxicidade pulmonar destes materiais permanecem indefinidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade de nanopartículas (NP) de óxido de níquel (NiO) em células derivadas de pulmão de hamster Chinês, V79. Os resultados com a cultura celular apontaram para um aumento significativo de danos no DNA das células expostas às concentrações de 62 – 500 µg/mL de NP de NiO no ensaio cometa. Estes dados, somados aos da literatura, contribuem para a caracterização do perfil genotóxico de nanomateriais.

Palavras-chave: Cometa; danos no DNA; V79; nanomateriais

### INTRODUÇÃO

Os nanomateriais são muito interessantes do ponto de vista toxicológico, uma vez que, devido a sua grande área superficial em relação à massa, tendem a ser mais reativos quando comparados aos mesmos componentes em macro escala. Além disso, podem, em alguns casos, ter potencial de danificar o DNA, seja diretamente ou indiretamente, através da indução de estresse oxidativo (COLLINS et al., 2017).

Pesquisas sobre nanopartículas de óxidos metálicos foram amplamente realizadas na última década, visto que seu campo de aplicação abrange muitas áreas, tais como

---

1 Aluna do curso de graduação em Ciências Biológicas – Bolsista PIBIC/CNPq – karolhonatel@gmail.com

2 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

3 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

5 Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

6 Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

7 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

8 Professor Orientador dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA ([rafael.rodriques@ulbra.br](mailto:rafael.rodriques@ulbra.br))

nanomedicina, refrigeração e construção de sensores, microeletrônica, catálise, ação bactericida (MELO et al., 2012; SPADARO et al., 2015).

O níquel é um metal de transição e é o quinto elemento mais abundante no mundo, logo, as nanopartículas de óxido de níquel possuem uma vasta aplicabilidade, como por exemplo, no uso de catalisadores químicos, sensores, filmes eletrocromáticos, dispositivos de armazenamento de energia, eletrodos de baterias, tintas de impressão, aditivo de combustível e sensores de materiais magnéticos (DUAN et al., 2015; KOVRIZNYCH et al., 2014).

Este trabalho avaliou o efeito genotóxico de NPs de óxido de níquel (NiO), buscando o entendimento de como estes nanomateriais ou seus subprodutos podem interagir em diferentes níveis celulares. Avaliar este contexto torna-se fundamental para a proteção da integridade do ser humano e do meio ambiente.

## **METODOLOGIA**

As NPs de NiO foram obtidas após 6 h de calcinação na temperatura de 550 °C. A caracterização morfológica e estrutural das NPs de NiO foi realizada por microscopia de transmissão (MET JEM 1200 EXII) no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS e a análise das imagens foi realizada através do software ImageJ 1.46r. As medidas de difração de raios-X foram realizadas utilizando a geometria de Bragg-Brentano (Rigaku – ULTIMA IV), com passo de 0,02º e tempo de integração de 5 s. A radiação usada no difratômetro teve potência no tubo de 40 kV/20mA.

As diferentes concentrações das NPs de NiO foram preparadas na hora do tratamento, por dissolução em água destilada. As NPs foram testadas em seis concentrações: 15, 31, 62, 125, 250 e 500 µg/mL. Para enfrentar o problema da aglomerabilidade das NPs, foi utilizado um aparelho de ultrassom (Maxi Clean 1600- Unique) para que fosse garantido o diâmetro da partícula em nível de nano nas soluções.

### **Teste Cometa**

As células V79 foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) em uma incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para a realização dos experimentos, as mesmas foram transferidas para placas de cultivo celular com 24 poços, sendo adicionadas em cada poço aproximadamente 100.000 células. Após 24 h, as seguintes concentrações de NiO NPs foram adicionadas: 15, 31, 62, 125, 250 e 500 µg/mL da mesma forma que o controle positivo EMS (Etilmetanosulfonato – 0,5 mM) e o controle negativo, H<sub>2</sub>O destilada, durante um período de 4h. Após este período, as células foram tripsinizadas, neutralizadas e homogeneizadas com gel de agarose de baixo ponto de fusão, distribuídas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com gel de agarose de ponto de fusão normal. Estas lâminas foram mergulhadas em solução de lise por 24 horas (89 mL de solução de lise do estoque, 10mL DMSO (Vetec), 1 mL de Triton X-100 (Vetec) a pH 10, ao abrigo da luz.). Em seguida, submetidas a um campo elétrico que induz a migração de fragmentos livres de DNA para fora do núcleo (na cuba da eletroforese: 20 minutos de descanso em solução tampão, 20 minutos de eletroforese, 36 volts, 300mA). Após a eletroforese em condições alcalinas (pH>13), as lâminas foram coradas com brometo de etídio e os núcleos das células portadoras de quebras de DNA puderam ser visualizados sob a forma de um cometa (TICE et al., 2000). Ao contrário do teste CBMN, o Cometa não requer o uso de células em proliferação e pode ser empregado para mensurar quebras de DNA em qualquer tipo de célula eucarionte. As lâminas foram codificadas antes da análise microscópica e coradas com 70 µL de brometo de etídio e cobertas com lamínula. Os nucleóides corados foram avaliados em aumento de 200X em um microscópio de fluorescência Olympus (BX41) com filtro de excitação 515 - 560 nm e filtro

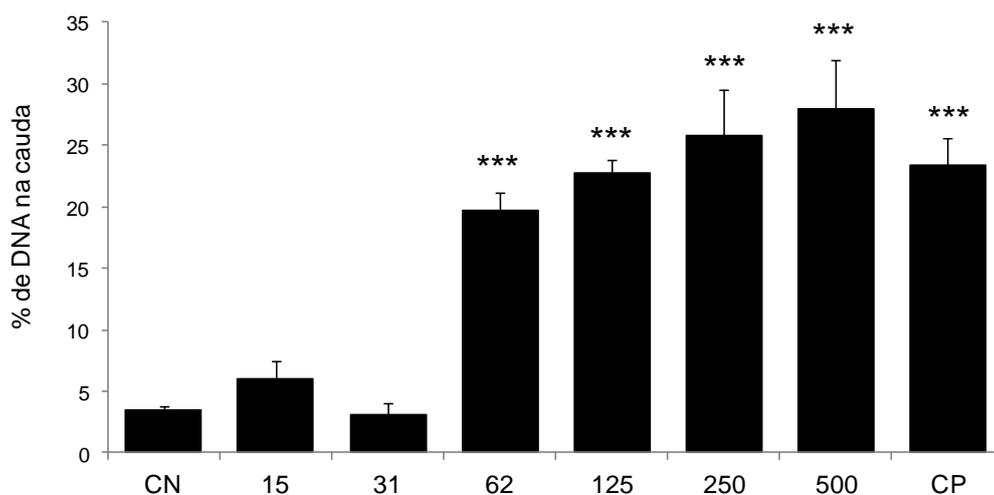
de barreira de 590 nm. Foram avaliados, para cada tratamento, a extensão dos danos no DNA através do ensaio do cometa, classificando-se os cometas por meio de um software (Comet Assay IV) (Perceptive Instruments) acoplado ao microscópio.

O parâmetro utilizado para a avaliação de danos foi a porcentagem de DNA na cauda (tail intensity). A comparação dos dados foi realizada da mesma forma que anteriormente descrito para o teste CBMN, utilizando-se a análise da variância (ANOVA) com teste post hoc de Dunnett para uma significância estatística  $p < 0,05$  (TICE et al., 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à avaliação da genotoxicidade das NPs de NiO em células V79 no Teste Cometa estão representados na Figura 1. Para avaliação de danos no DNA, o parâmetro utilizado foi a porcentagem de DNA na cauda (tail intensity). Desta maneira, foi possível observar um aumento significativo na frequência de danos no DNA das células expostas às concentrações de 62, 125, 250, e 500  $\mu\text{g/mL}$  de NPs de NiO quando comparado ao controle negativo.

Figura 1: Danos no DNA após exposição (4h) das células V79 às diferentes concentrações (15 – 500  $\mu\text{g/mL}$ ) de NP de NiO. CN- Controle Negativo. CP – Controle Positivo (EMS 0,5 mM). One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. \*\*\*\* $P < 0,001$ .



Os nossos resultados estão de acordo com trabalhos publicados previamente na literatura com células V79 expostas a nanomateriais no teste cometa alcalino. Nesse sentido, Maser et al. (2015) avaliaram o potencial genotóxico de NPs de SiO<sub>2</sub> na versão alcalina do ensaio cometa em células V79. Os resultados demonstraram que concentrações de NPs acima de 600  $\mu\text{g/mL}$  foram genotóxicas após tratamento de 24 h. Adicionalmente, concentrações acima de 250  $\mu\text{g/mL}$  de NPs de NiO foram genotóxicas no ensaio cometa em células epiteliais de rim, NRK-52E (ABUDAYYAK et al., 2017). Os mesmos autores verificaram aumento de danos no DNA, no ensaio cometa, após exposição de células neuronais (SH-SY5Y) a concentrações (15 – 120  $\mu\text{g/mL}$ ) de NPs de NiO. Apesar de os mecanismos de ação biológica das NPs de NiO não terem sido totalmente compreendidos, a indução de estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio parece estar associada a genotoxicidade deste nanomaterial (GALEGO et al., 2007).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que as NPs de NiO induzem aumentos significativos de danos no DNA das células V79 expostas a concentrações superiores a 62 µg/mL no ensaio Cometa. Estes dados, somados aos da literatura, contribuem para a caracterização do perfil genotóxico de nanomateriais.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Edital Universal/ 2014 e pela concessão da bolsa PIBIC.

## REFERÊNCIAS

- ABUDAYYAK, Mahmoud; GUZEL, Elif; ÖZHAN, Gül. Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. **Neurochemistry International**, 2017.
- COLLINS, Andrew; EL YAMANI, Naouale; DUSINSKA, Maria. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017.
- DUAN, Wei-Xia et al. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 286, n. 2, p. 80-91, 2015.
- GALLEGO, Andrea et al. Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. **Chemosphere**, v. 68, n. 4, p. 647-661, 2007.
- KOVRIŽNYCH, Jevgenij A. et al. Long-term (30 days) toxicity of NiO nanoparticles for adult zebrafish *Danio rerio*. **Interdisciplinary toxicology**, v. 7, n. 1, p. 23-26, 2014.
- MASER, Elena et al. In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 794, p. 57-74, 2015.
- MELO JR, Maurício Alves et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, 2012.
- SPADARO, Maria Chiara et al. Tunability of exchange bias in Ni@NiO core-shell nanoparticles obtained by sequential layer deposition. **Nanotechnology**, v. 26, n. 40, p. 405704, 2015.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.