

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ausência da atividade mutagênica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluna: Nayane Moreira Machado

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**UBERLÂNDIA - MG
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ausência da atividade mutagênica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluna: Nayane Moreira Machado

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de concentração: Genética).

**UBERLÂNDIA - MG
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M149a Machado, Nayane Moreira, 1987-
2012 Ausência da atividade mutagênica de nanotubos de carbono de paredes múltipla, funcionalizados, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Nayane Moreira Machado. -- 2012. 54 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Nanotubos de carbono - Teses. 3. *Drosophila melanogaster* - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Palavras-chave: Nanotubos de carbono. SMART. Mutagênico. *Drosophila melanogaster*.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ausência da atividade mutagênica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluna: Nayane MoreiraMachado

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno (Orientador)

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva
Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Data da Defesa: 30/07/2012

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança.”

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ubaldo Machado de Araújo e Maria Helena de Araújo**, e aos meus irmãos, **Carley Alexandre Moreira Machado e Helber Moreira Machado**. Pelo amor, apoio e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. Tenho muita gente para agradecer e nem sei por onde começar, mas sempre há que se começar por algum lugar, neste caso, por alguém.

Em primeiro lugar quero agradecer a **Deus**, não por clichê ou algo assim, mas para ser justa. Por me iluminar, me guiar, me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e suprir minhas necessidades.

Agradeço também de modo muito especial a todos meus familiares. Aos meus pais, **Ubaldo Machado de Araújo** e **Maria Helena de Araújo**, que me deram não somente a vida, mas principalmente a educação, me ensinando a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Aos meus irmãos, **Carley Alexandre Moreira Machado** e **Helber Moreira Machado**, por permanecerem ao meu lado encorajando-me nas horas difíceis e aplaudindo nos momentos de glória. As minhas cunhadas, **Adriana Cláudia Veloso Santos** e **Juliane Tayse Ribeiro Maia**, obrigada pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

Ao meu orientador, professor **Dr. Júlio César Nepomuceno**, fonte de inspiração, apoio e ensino diário. Obrigada por tudo, não somente pela orientação em toda minha vida acadêmica, mas principalmente pelo exemplo de pessoa e profissional.

Quero expressar também sinceros agradecimentos a toda equipe do **Laboratório de Citogenética e Mutagenese**, a todos os monitores, que no processo inquietador de elaboração da dissertação, terminaram por ser envolvidos. Em especial, **Bethânia Cristhine**, **Adriana Cristina**, **Lívila Mara**, **Geovanne D'Alfonso**, **Priscila Capelari** e **Rosiane Gomes** pela formação de uma verdadeira rede de solidariedade e afeto.

Aos meus colegas de mestrado, e companheiros de moradia, **Rosiane Soares Saturnino** e **Jeyson Césary Lopes**, pela amizade desde o tempo da faculdade. Obrigada por ter aguentado minha ansiedade em todas as grandes etapas que o mestrado possui, minha choradeira nos momentos de desespero,

minha tagarelice nos momentos de empolgação. Foi uma experiência inesquecível o tempo que passamos juntos em Uberlândia.

Aos amigos que eu tenho que me ajudaram tanto, mas tanto, que eu teria que agradecer infinitamente cada um deles, ainda que não tenham contribuído em nada para a própria pesquisa, eu tenho que agradecer simplesmente por serem meus amigos. Nesse sentido, mando um “muitíssimo obrigado” a: **Morgana Porto**, que mesmo longe se fez tão presente nesses dois anos em todos os momentos. Obrigada por todo carinho e apoio. **Elaine Gonçalves**, uma companheira de todas as horas, a qual tenho profundo apreço e consideração. **Mosar Corrêa** e **Roberto Ghabar**, meus amigos e parceiros. Como agradecer todo o carinho que tiveram comigo nesses últimos tempos? Obrigada pelo respeito, zelo e amizade. **Lilianne Machado, Paula Melo, Ruth Germana, Janaína Coelho, Larissa Ribeiro** e **Priscila D’ Paula**, a vocês agradeço essa amizade linda, verdadeira e duradoura. A vida de gente grande que temos hoje não nos permite mais tantos reencontros, mas mesmo assim a amizade, respeito e consideração continuaram. E sempre encontro em cada uma de vocês o abraço mais sincero. Obrigada por torcerem por mim!

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas inesquecíveis, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Eng. Agr. Dr. Evandro Binotto Fagan** do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) juntamente ao **Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves** do Laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química em Campinas, São Paulo, por tão gentilmente ceder os nanotubos de carbono testados neste trabalho. Obrigada pela confiança.

Aos membros da banca avaliadora, **Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva** e **Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade**, pela disponibilidade e as considerações imprescindíveis para a confecção final deste trabalho.

Ao **Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos professores da pós-graduação do Departamento de Genética e Bioquímica, agradeço pelos ensinamentos concedidos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPQ) pela bolsa concedida durante os anos de mestrado.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG;
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU;
- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

LISTA DE ABREVIATURAS

BH - *Balancer Heterozygous* - Heterozigoto balanceado

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DXR - Doxorrubicina

Flr³ - *Flare* – Pêlo mutante em forma de chama

HB - *High bioactivation cross*- Cruzamento de alta bioativação

MH - *Marker Heterozygous* - heterozigoto marcado

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

Mwh - *Multiple wing hairs* – Pêlos múltiplos

MSP – Manchas simples pequena

MSG – Manchas simples grande

MG – Manchas gêmeas

NTC – Nanotubo de carbono

NTCPD – Nanotubo de carbono de parede dupla

NTCPS – Nanotubo de carbono de parede simples

NTCPM – Nanotubo de carbono de parede múltipla

ORR - Oregon R (*R*)

SMART - *Somatic Mutation and Recombination Test*

ST - *Standard Cross*- Cruzamento padrão

TM3 Bd^s - *Third Multiple3 Beaded Serrate*

µg - Micrograma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de NTCPM funcionalizados (0,50, 100, 150, 200, 250 µg/mL), controle positivo (DXR 0,4 mM) e controle negativo (água osmose reversa)..... 39

Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), tratados com diferentes concentrações de NTCPM funcionalizados (0,50, 100, 150, 200, 250 µg/mL), controle positivo (DXR 0,4 mM) e controle negativo (água osmose reversa)..... 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da Carcinogênese.....	5
Figura 2: Tipos de nanotubos. (A) nanotubo de parede simples. (B) nanotubos de paredes múltiplas. (C) nanotubo de parede dupla	6
Figura 3: Categorias de nanotubos de parede simples: armchair, zigzag e chiral....	8
Figura 4: Estrutura química da Doxorrubicina.....	9
Figura 5: Fenótipo das asas dos descendentes de <i>Drosophila melanogaster</i> : asa de borda lisa.....	14
Figura 6: Fenótipo das asas dos descendentes de <i>Drosophila melanogaster</i> : asa de borda serrilhada.....	18
Figura 7: Mancha simples, pêlos <i>mwh</i> - Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x).....	19
Figura 8: Mancha gêmea, pêlos <i>mwh</i> e <i>flr³</i> - Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x).....	20
Figura 9: Sequência de Análise da Asa.....	20

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	01
-------------------	----

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Estudo molecular do câncer.....	4
1.2 Nanotubos de carbono.....	7
1.3 Nanotubos para carreamento de fármacos.....	11
1.4 Doxorrubicina.....	13
1.5 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (<i>Somatic Mutation and Recombination Test- SMART</i>) em células de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.5.1 Linhagens Mutantes de <i>Drosophila Melanogaster</i>	16
1.5.2 Cruzamentos.....	17
1.5.3 Manchas nas asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
REFERÊNCIAS.....	21

CAPÍTULO 2

RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Agentes químicos.....	31
2.2 Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
2.2.1 Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento.....	32
2.2.2 Preparação e análise microscópica das lâminas	33
2.2.3 Análise estatística.....	34

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	41

APRESENTAÇÃO

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica. A nanotecnologia vem revolucionando uma série de setores como áreas da medicina terapêutica, agricultura, assim como da indústria bélica e automobilística.

Diferentes métodos para a síntese de nanopartículas permitem a modulação da sua estrutura, composição e propriedades fisiológicas. Dentro deste contexto, destacam-se os nanotubos de carbono que apresentam propriedades eletrônicas e estruturais singulares, podendo ser metais ou semicondutores, de acordo com as suas características geométricas. São materiais extremamente susceptíveis a tensões mecânicas e de alta superfície de adsorção, o que os torna aptos para utilização em sensores químicos e biológicos, além de serem altamente estáveis.

As propriedades dos nanotubos de carbono estão diretamente relacionadas ao fato de serem de parede única ou simples, constituídos apenas por uma camada cilíndrica de grafite, ou por uma parede múltipla composta por vários cilindros concêntricos de grafite. Dependem também do diâmetro e da maneira pela qual os cilindros de carbono podem ser encontrados, com pontas fechadas ou abertas.

Após pouco mais de uma década de sua descoberta, os conhecimentos produzidos nesta área indicam que os nanotubos podem ser utilizados em numerosas aplicações práticas. E com tantas implicações almejadas, torna-se claro a necessidade de se conhecer seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, antes que estes materiais possam ser incorporados como veiculadores de drogas e vacinas.

Diante disso, este trabalho tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos mutagênicos de nanotubos de carbono de parede múltipla, funcionalizados nas concentrações de 50; 100; 150; 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ usando o teste para

detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*.

Com o intuito de facilitar a leitura, o trabalho foi estruturado sob a forma de capítulos. O capítulo I traz a fundamentação teórica abordando assuntos como à suscetibilidade genética e a interação entre fatores genéticos e ambientais, que podem esclarecer e viabilizar novas estratégias de prevenção e tratamento do câncer. Em seguida, são abordados os nanotubos de carbono e sua utilização para carreamento de fármacos, possibilitando o melhoramento de perfis farmacológicos. Posteriormente, os mecanismos de ação da doxorubicina, que é um quimioterápico utilizado em estudos como controle positivo. E para finalizar, o teste de detecção, mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*.

O capítulo II apresenta o manuscrito intitulado “Absence of mutagenic activity of carbon nanotubes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, que será enviado para publicação no periódico Food and Chemical Toxicology.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Estudo molecular do câncer

O termo câncer foi associado à doença pelo médico grego Hipócrates, por volta do ano 400 a.C., quando foi dado à moléstia o nome de *karkinoma* (carcinoma). Embora isso mostre que a doença já era conhecida, a natureza do câncer estava muito longe de ser compreendida. Apenas nas últimas décadas, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos tumores malignos começaram a ser desvendados (MORI, 2002).

O câncer é uma doença associada a múltiplas alterações genéticas, originando-se a partir de uma única célula normal que acumulou mutações, após sucessivas divisões celulares em um processo de evolução clonal (CAVENEE; WHITE, 1995).

As alterações genéticas podem ocorrer em qualquer célula, em qualquer estágio do ciclo celular, resultantes de mutações gênicas, aberrações cromossômicas, recombinações e elementos genéticos de transposição (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Em geral, as mutações incluem alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos simples ou extremamente complexos (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008). Independente do tipo, a mutação origina uma troca na informação contida no gene e leva à síntese de uma proteína diferente da esperada ou à ausência de síntese (HIB; ROBERTIS, 2006).

As mutações podem ocorrer em células da linhagem germinativa, bem como em células somáticas. No entanto, apenas as primeiras podem ser perpetuadas de uma geração à seguinte, sendo desse modo, responsáveis pelas doenças hereditárias. Por outro lado as que ocorrem nas células somáticas podem resultar na morte do portador ou na diminuição da função celular. Quando ocorrem em vários genes, podem originar uma proporção significativa de cânceres (LOURO *et al.*, 2002).

Qualquer uma dessas mutações pode ocorrer espontaneamente, originando-se como resultado do próprio metabolismo celular ou das interações com o meio ambiente; e geralmente ocorrem com uma frequência característica

em cada tipo de organismo. Entretanto, muitas mutações podem ser induzidas por agentes físicos, biológicos e químicos, que são então denominados agentes mutagênicos (LOURO *et al.*, 2002).

Esses chamados agentes mutagênicos que vão alterar a sequência das bases no DNA, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão levar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento da doença (RIBEIRO; MARQUES, 2003), como mostra a Figura 1.

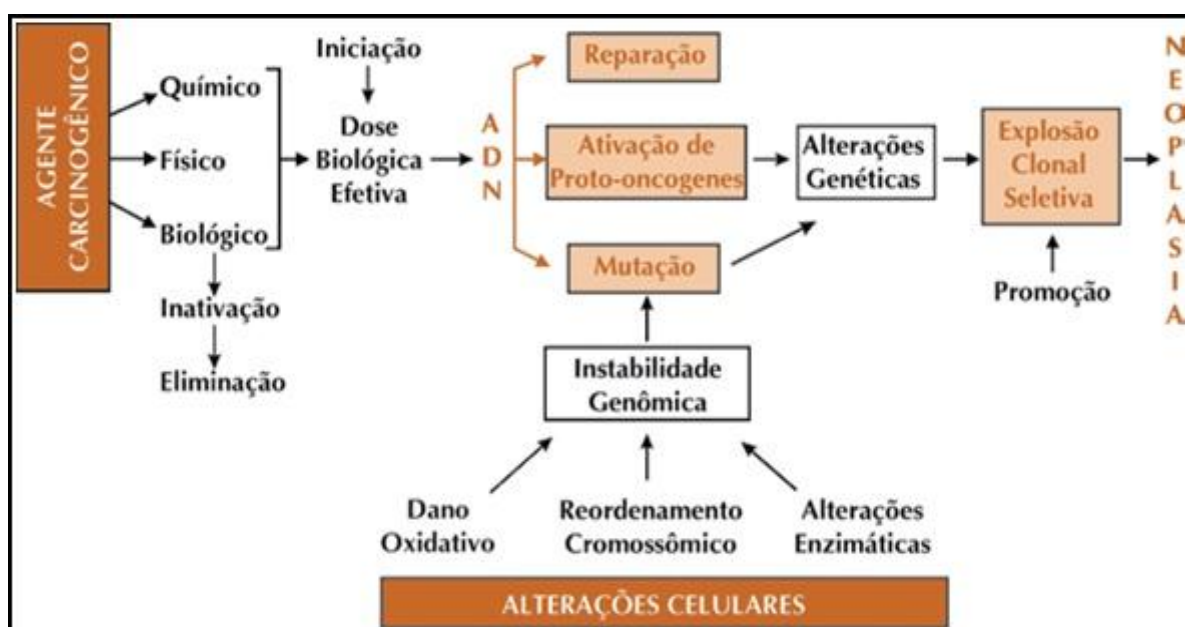


Figura 1: As etapas da carcinogênese

Fonte: INCA (2008)

Torna-se claro, portanto, que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais (Figura 2), sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais “externos” que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (LOURO *et al.*, 2002).

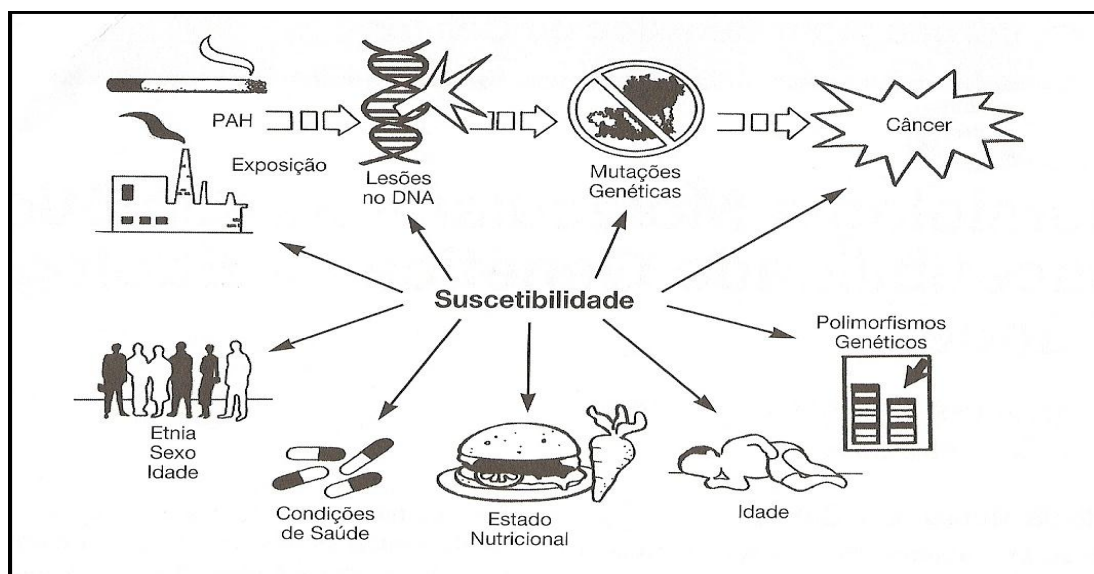


Figura 2: Fatores genéticos e ambientais.

Fonte: Louro (2002).

Após a célula ter-se tornado cancerosa, ela continua a acumular mutações, alterando suas propriedades e adquirindo características como maior mobilidade, com conseqüente invasão da membrana basal, dos vasos sanguíneos e linfáticos (OJOPI; DIAS NETO, 2004). Esta perda do controle da proliferação celular é consequência direta de danos nos mecanismos de regulação do ciclo celular e, deste modo, podemos afirmar, embora simplisticamente, que o câncer caracteriza-se por ser, em última instância, uma doença que resulta dos danos ocorridos nos genes que controlam o ciclo celular (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são aqueles que atuam na regulação da proliferação celular, tais como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (LOURO *et al.*, 2002).

Os proto-oncogenes são genes ligados aos processos de proliferação e diferenciação que ocorrem nas células normais. Porém quando ocorrem alterações nesses proto-oncogenes eles podem tornar-se oncogenes. Os produtos dos oncogenes são capazes de manter o estímulo permanente para a divisão celular, pois ou não respondem ao comando regulatório ou mantêm sua função de estímulo mitótico, independente de estímulos externos (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

Enquanto os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada, a atuação dos genes supressores de tumor mantém essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular (LOURO *et al.*, 2002). Existem aproximadamente 30 genes supressores tumorais identificados que codificam para proteínas reguladoras dos checkpoints celulares e inibem a progressão do ciclo celular, caso o DNA esteja danificado (WEINBERG, 1991).

A identificação desses genes envolvidos no câncer proporciona uma melhor compreensão acerca da doença, bem como contribui para novas formas precoces de diagnóstico, facilitando assim o seu tratamento (DANTAS *et al.*, 2009).

1.2 Nanotubos de carbono

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se destacado como uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos produtos nas mais variadas áreas (HERBST; ROCCO, 2004). Em função do tamanho diminuto das nanoestruturas (RIETH, 2003) a nanotecnologia permite a fabricação, caracterização, manipulação e utilização de materiais com novas propriedades e funções (GUPTA; GUPTA, 2005). Estas descobertas deram origem a estudos que estão inseridos no que hoje se denomina nanociências (NASCIMENTO, 2008).

Um dos frutos do interesse pelo domínio das pequenas dimensões foi a obtenção dos nanotubos de carbono. Inicialmente imaginava-se que o carbono formava apenas duas estruturas cristalinas, o grafite e o diamante. No entanto, em 1985, dois químicos, Harold Kroto e James Heath demonstraram a existência de fulerenos, estruturas de carbono ocas com o formato de uma bola de futebol. De acordo com Nascimento (2008), em 1991, Iijima demonstrou pela primeira vez ao mundo a existência de estruturas tubulares de carbono, que denominou de nanotubos de carbono (NC). NCs são nanoestruturas únicas com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis. São as moléculas mais rígidas, mecanicamente flexíveis, mas resistentes a diferentes tensões que já foram produzidas (KLAINÉ, 2008). Os nanotubos podem ser classificados como sistemas unidimensionais, descritos a partir de algumas folhas de grafite (grafeno) dispostas na forma de cilindros concêntricos (NASCIMENTO, 2008).

Do ponto de vista estrutural (Figura 3), há dois tipos de NC que podem apresentar alta perfeição: os nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS), que podem ser considerados como uma única folha de grafite enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico (a), e os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) que compreendem um conjunto de nanotubos concêntricos (b), (HERBST; ROCCO, 2004). E há ainda um tipo especial de nanotubo formado por apenas duas folhas de grafite que se sobrepõem. Estes são os nanotubos de parede dupla (c).

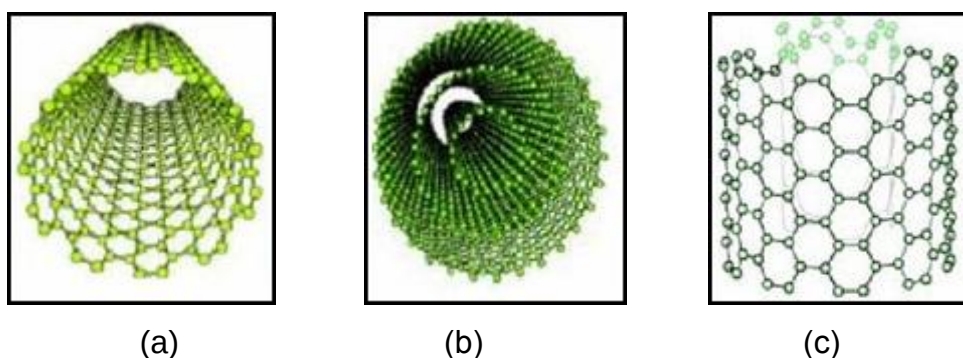


Figura 3: (a) nanotubo de parede simples. (b) nanotubo de paredes múltiplas. (c) nanotubo parede dupla

Fonte: DRESSELHAUS et. al. (1998) apud NASCIMENTO (2008).

É importante notar que a maneira pela qual a folha de grafeno é enrolada determina a estrutura dos nanotubos e suas propriedades físicas. Os dois parâmetros estruturais relevantes dos nanotubos são: diâmetro (dt) e ângulo quiral (θ) (também chamado de quiralidade ou helicidade (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007)).

Nanotubos de carbono de parede simples podem ser separados em três categorias: armchair, zigzag ou chiral (Figura 4). Este ângulo de enrolamento define se os nanotubos são condutores metálicos ou semicondutores. Estas três categorias têm propriedades distintas: todos os armchair apresentam propriedades metálicas e as outras duas estruturas podem apresentar propriedades semicondutoras ou metálicas, dependendo do diâmetro do nanotubo (LOUIE, 2001).

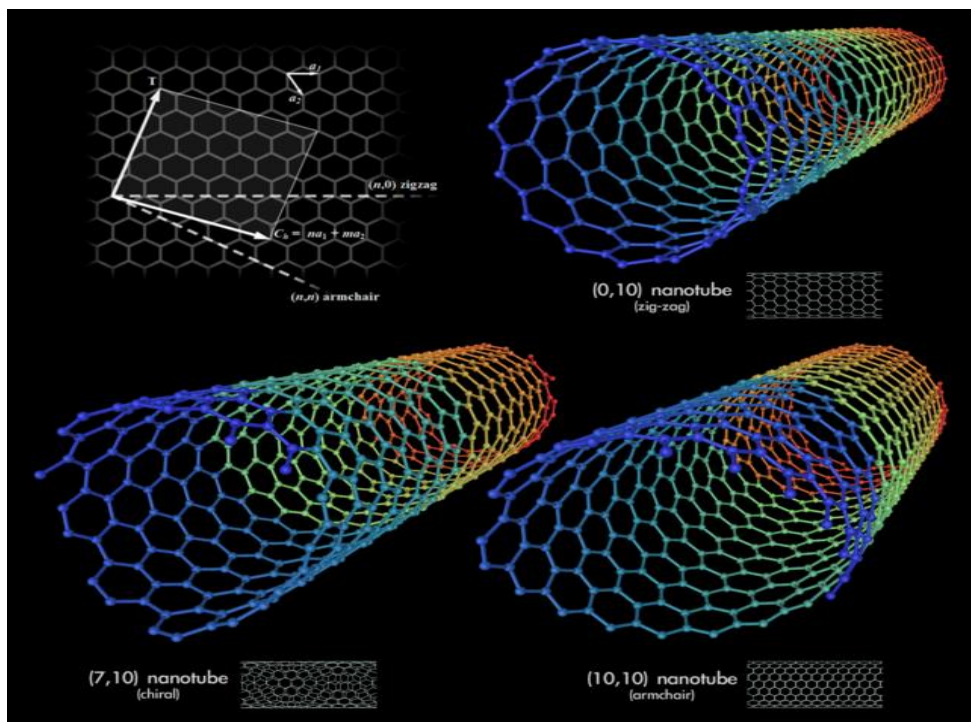


Figura 4: nanotubos de parede simples armchair, zigzag e chiral

Fonte: Educador ciência (2008).

Os nanotubos de paredes múltiplas com uma estrutura livre de defeitos apresentam propriedades eletrônicas similares aos de parede simples. Isto acontece devido a condução ocorrer preferencialmente na direção longitudinal do nanotubo, assim há pouca interação entre as paredes. Esta propriedade permite ao nanotubo suportar uma grande intensidade de corrente elétrica (LIANG *et al.*, 2000).

Características como forma, simetria, condições, taxa de crescimento, rendimento e cristalinidade dos materiais são influenciados pela seleção do catalisador, fonte de carbono, temperatura e tempo de reação, levando a uma heterogeneidade significativa entre os produtos finais (SANCHEZ *et al.*, 2010).

Os métodos usuais de fabricação de nanotubos de carbono são: deposição de vapor químico, descarga de arco e ablação a laser. O diâmetro das fibras depende das dimensões das nanopartículas de metal usado como um catalisador, e a orientação das camadas de grafeno pode ser dirigido pela temperatura de crescimento e/ ou a natureza do metal (SANCHEZ *et al.*, 2010).

A funcionalização de nanotubos de carbono através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento tem sido vista como uma forma de explorar o

potencial dos nanotubos de carbono na nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas que são substancialmente diferentes dos nanotubos não funcionalizados e este fenômeno é explorado para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletro-mecânicos em escala nanométrica devido a sua grande resistência e flexibilidade mecânica (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007).

A diversidade das aplicações, reais ou potenciais, dos NC, assim como a necessidade de controlar as morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente multidisciplinar (HERBST; ROCCO, 2004), atuando em diferentes áreas do conhecimento: como na investigação das propriedades elementares, físicas e químicas, dos nanomateriais; no desenvolvimento de novos métodos de síntese e funcionalização de nanoestruturas; na aplicação de sistemas nanoestruturados em liberação controlada de fármacos; no desenvolvimento de novos dispositivos eletrônicos, assim como dos impactos ambientais ocasionados pelo seu uso (NASCIMENTO 2008).

Atualmente, inúmeros estudos têm focado nas propriedades genotóxicas de nanotubos de carbono, mostrando que nanotubos de parede simples ou paredes múltiplas podem induzir danos no DNA, formação de micronúcleos, interrupção do fuso mitótico, e a indução de poliploidia (KISIN *et al.*, 2011).

Os mecanismos de toxicidade de nanomateriais ainda não foram totalmente elucidados, mas evidências recentes sugerem pontos de semelhança com fibras de amianto, incluindo um papel na geração de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e genotoxicidade (SANCHEZ *et al.*, 2010). Por outro lado, os nanotubos de carbono podem ser facilmente funcionalizados (SHVEDOVA *et al.*, 2009) o que facilita a sua interação com moléculas orgânicas e biológicas com outros grupos químicos como fármacos ou moléculas tóxicas, formando um recipiente versátil para carreamento de drogas (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007) sugerindo que os nanotubos de carbono podem ter um lugar no arsenal para o tratamento e acompanhamento do câncer, infecções e outras condições de doença (SHVEDOVA *et al.*, 2009).

1.3 Nanotubos para carreamento de fármacos

Hoje, as pesquisas em nanotubos de carbono cruzam as fronteiras da física, da química, das ciências dos materiais, da biologia e desenvolvem-se rapidamente no campo da farmacologia (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007). A denominada tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência onde envolve diferentes aspectos para o avanço da saúde humana. Estes sistemas de liberação possibilitam o melhoramento de perfis farmacológicos de muitas classes de moléculas terapêuticas (FARAJI; WIPF, 2009; HAMIDI *et al.*, 2008).

O entendimento dos métodos de síntese das propriedades nanométricas têm possibilitado o desenvolvimento de sistemas exatos de diagnósticos e de terapia do câncer, como a entrega da droga diretamente na célula cancerosa (*Drug Delivery Systems*), assim diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. Estima-se que os sistemas entregadores de drogas utilizem uma quantidade 100 vezes menor do agente ativo e sejam 100 vezes mais eficientes (JAIN, 2008).

Sistemas nanométricos que são utilizados nos *Drug Delivery Systems* oferecem como grande vantagem a diminuição ou eliminação dos severos efeitos colaterais da quimioterapia. Estes atuam diretamente nas células cancerosas, não ficando livres na via sistêmica. Os possíveis diagnósticos em estágios iniciais da doença e de drogas precisas (no sentido de atingir um alvo desejado, no caso a célula do câncer) têm contribuído para o desenvolvimento da medicina personalizada com o tratamento de cada paciente de forma individualizada (JABR-MILANE *et al.*, 2008).

Os tratamentos que envolvem os sistemas entregadores de drogas podem ser divididos em duas etapas: passivo e ativo. No tratamento passivo, o agente terapêutico é incorporado dentro de uma macromolécula ou de uma nanopartícula (nanocápsulas), onde circulam pela corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR). Para que as nanopartículas possam circular o tempo suficiente dentro do organismo elas

devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um “corpo estranho”. No tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer (SINGH; LILLARD, 2009; SHEKHAR, 2009).

A incorporação das drogas às nanopartículas pode ocorrer por diversos métodos, que em muitos casos utilizam mecanismos de auto-organização. As drogas podem, por exemplo, ser dispersas em uma matriz polimérica, encapsuladas no núcleo ou adsorvidas na superfície das nanopartículas (HANS, 2006). Vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas, quitosana), nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomos, pontos quânticos e nanotubos de carbono, que serão aqui abordados, assim como os conjugados envolvendo essas nanopartículas (JAIN, 2008).

Estudos com nanotubos de carbono, de paredes simples funcionalizados com ligantes específicos, demonstram que podem ser utilizados na terapia do câncer. Sabe-se que os sistemas biológicos são transparentes à radiação eletromagnética na faixa de 700 a 1100 nm (NIR), enquanto os nanotubos de carbono de paredes simples apresentam uma elevada absorção. Portanto, uma radiação contínua na região pode causar a morte das células do câncer pelo acúmulo de calor local dos nanotubos de carbono de paredes simples (KAM *et al.*, 2005).

Os nanotubos também estão sendo utilizados para monitorar certas proteínas associadas ao câncer, pois são extremamente sensíveis, e qualquer ligação que se forme em sua superfície é observada por uma mudança nas propriedades elétricas. Nanotubos com anticorpos ligados à sua superfície são utilizados para detectar células cancerosas na corrente sanguínea. Nesse sistema, quando uma molécula relacionada à célula cancerosa se liga ao nanotubo, é observada uma variação na corrente elétrica. Este método pode ser utilizado para detecção de células tumorais na corrente sanguínea ou micro metástases, remanescentes de um tratamento no tumor original (SINGH; LILLARD, 2009).

Apesar do exposto acima ainda há muito para ser feito para explorar as intrínsecas propriedades dos nanotubos de carbonos (DRESSELHAUS, 2004). Desafios que precisam ser resolvidos antes do uso generalizado de nanobiotecnologia em oncologia clínica, tal como: analisar e comparar a toxicidade potencial e a capacidade para induzir danos no DNA de diferentes nanotubos de carbono. Para sanar esse problema extensas investigações estão em andamento, mas ainda não há um consenso sobre os reais riscos reais - devido à falta de dados e a complexidade dos nanomateriais. Diante disso, este trabalho torna-se relevante à medida que colabora para este processo de investigação já que objetiva os nanotubos de parede múltipla funcionais em relação ao seu potencial genotóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

1.4 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DXR) (Figura 5) é um quimioterápico do grupo das antraciclinas (MARTINS *et al.*, 2011) isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (DOROSHOW, 1996 apud NEUWALD, 2009 ; SILVA *et al.*, 2004)..

É utilizada clinicamente desde a década de 1960 e representa uma das classes mais utilizadas de agentes antineoplásicos, sendo de uso corrente em oncologia humana (GALIOTTO, 2007).

A doxorrubicina tem uma ampla atividade antitumoral (GALIOTTO, 2007), e tem sido utilizado com êxito para regressão de cânceres da mama, pulmão, bexiga, tireoide, carcinoma ovariano, sarcomas ósseos e dos tecidos moles, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms e leucemias (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

No entanto, seu uso é limitado em função do desenvolvimento de toxicidade cardíaca (TALLAJ *et al.*, 2005), que é cumulativa e irreversível. (ROCHA *et al.*, 2001) A cardiomiopatia e a insuficiência cardíaca são condições clínicas graves com alta morbidade e mortalidade, que interferem negativamente na curva de sobrevida dos pacientes com câncer. A cardiotoxicidade pela DXR pode se manifestar até 20 anos após a quimioterapia (MARTINS *et al.*, 2011).

Além disso, a doxorrubicina provoca, também, diversas manifestações tóxicas como aberrações cromossômicas, alopecia (ROCHA *et al.*, 2001) tromboplastina, estomatite, anemia, perturbações gastrointestinais e manifestações dermatológicas (GILMAN *et al.*, 1996).

Outros estudos demonstraram, que a DXR induz mutações e recombinações somáticas em células de asas, de *Drosophila melanogaster* (LEHMANN *et al.*, 2003; COSTA E NEPOMUCENO, 2006; FRAGIORGE *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2008).

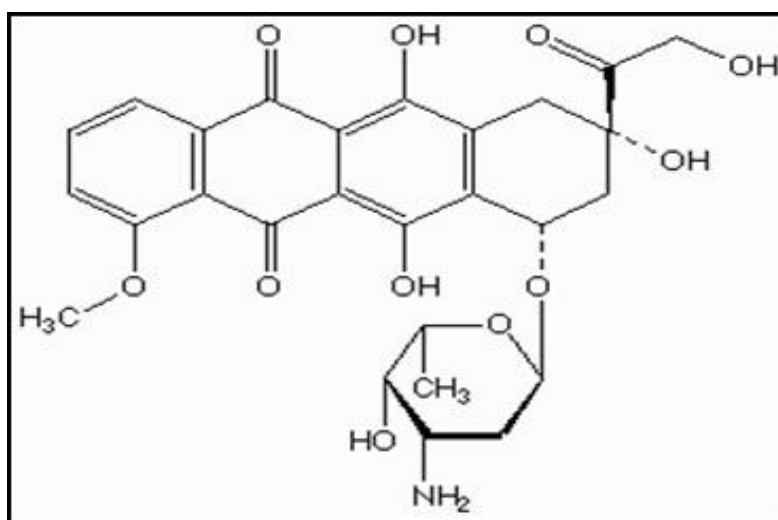


Figura 5: Estrutura química da Doxorrubicina.

Fonte: Fonte: Hardman; Limbird e Gilman (2001).

O mecanismo de ação das antraciclinas está relacionado com a capacidade desses compostos de intercalar com a molécula de DNA, afetando muitas de suas ações, bem como a síntese de DNA E RNA (HARDMAN *et al.*, 2002). A interação da doxorrubicina com a topoisomerase-II pode, ainda, desencadear a quebra do DNA e gerar radicais de oxigênio livres, altamente reativos e tóxicos (PFIZER ITÁLIA S.r.l., 2006). Assim, a doxorrubicina tem ação mutagênica e carcinogênica (CHABNER *et al.*, 2001 *apud* NEUWALD, 2009).

Além disso, a molécula reage com a citocromo P450 redutase na presença de NADPH para formar intermediários radicais semiquinonas, os quais são capazes de reagir com oxigênio para produzirem radicais de ânions superóxido, que são altamente destrutivos para a célula (KEIZER *et al.*, 1990). Os radicais gerados incluem peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, os quais

atacam o DNA e oxidam as suas bases (HAHN; RICHARDSON 1995 *apud* NEUWALD, 2009).

Ainda há de se ressaltar que a quimioterapia é o principal método utilizado no tratamento antineoplásico, com objetivo de eliminar as células que compõem o tumor. No entanto, a quimioterapia do câncer utiliza fármacos inespecíficos, como a doxorubicina, drogas que não são capazes de atingir apenas as células tumorais, mas também atingem diretamente vários tipos celulares de multiplicação rápida, como células gastrointestinais, capilares e precursores sanguíneos da medula óssea. Como consequência, estas células podem entrar num processo de instabilidade genômica que tende a culminar no aparecimento de um tumor secundário, caracterizando assim a toxicidade mediada pelos antineoplásicos (GALIOTTO, 2007).

Neste contexto, ressalta-se a importância da aplicação da nanobiotecnologia para o tratamento do câncer. As nanopartículas permitem a entrega alvo da droga podendo atravessar algumas das barreiras biológicas e atingir o tumor com concentrações terapêuticas, poupando os tecidos normais, circunvizinhos, dos efeitos tóxicos. Isto significa que as doses mais elevadas da droga podem ser entregues, aumentando seus efeitos anticancerígenos, enquanto diminui os efeitos colaterais associados com a quimioterapia sistêmica (JAIN, 2010).

1.5 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test- SMART*) em células de *Drosophila melanogaster*

O SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*) é o teste utilizado para detecção de mutação e recombinação somáticas. De acordo com Graf *et al.* (1984) e Vogel (1987), o SMART permite avaliar vários eventos como mutações pontuais, deleções ou tipos específicos de translocação, assim como, recombinação mitótica. O teste foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas de *Drosophila melanogaster*.

O teste possui uma alta eficiência para detectar a atividade genotóxica de mutágenos pertencentes a várias classes químicas. O espectro de compostos cuja genotoxicidade pode ser detectada com este bioensaio vai desde agentes alquilantes, com forte atuação, a um grande número de promutágenos, ativados por diferentes vias metabólicas de biotransformação enzimática. A versatilidade do procedimento experimental permite testar desde compostos estáveis a compostos instáveis (GRAF *et al.*, 1984).

O SMART utiliza a *Drosophila melanogaster* como animal experimental, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes, linhagens bem caracterizadas, além do baixo custo, rapidez e confiabilidade dos testes (GRAF *et al.*, 1984; VOGEL, 1987).

1.5.1 Linhagens Mutantes de *Drosophila melanogaster*

Para a realização do teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de *Drosophila melanogaster* são utilizadas três linhagens mutantes. A linhagem *mwh*, possui no cromossomo-3, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pelos das asas da *D. melanogaster*. Esse alelo está presente em homozigose na linhagem *mwh*. As asas da *D. melanogaster* são caracterizadas por possuir um único pelo por célula, porém, quando estas possuem o alelo mutante *mwh*, o fenótipo apresentado será de três ou mais pêlos por células (FRÖLICH; WÜRGLER, 1989).

A linhagem *flr*³, assim como a *mwh*, possui também um marcador no cromossomo-3, porém, em uma posição mais próxima ao centrômero, um alelo mutante que altera, também, o fenótipo dos pêlos da asa. O fenótipo provocado por este alelo mutante é um pêlo “deformado” que se assemelha a uma chama. Contudo, a linhagem não possui este alelo em homozigose nas células do seu corpo, pois seria letal para o indivíduo. Com isso, a linhagem estoque é mantida em um cromossomo, o gene *flr*³ e no mesmo locus, no outro cromossomo, um balanceador que possui múltiplas inversões, e recebe o nome de *TM3 Bd*^s. Portanto, a mutação *flr*³ será viável, apenas quando algumas células do disco imaginal carregarem a mutação (GRAF *et al.*, 1984).

Já a linhagem *ORR* de *D. melanogaster*, também utilizada no teste, foi construída com o objetivo de aumentar a capacidade metabólica na ativação de promutágenos. Alguns aspectos do controle genético do metabolismo de xenobióticos em *D. melanogaster* já são conhecidos. Na linhagem resistente ao DDT, *Oregon R* (R), o gene *Rl* na posição 65,0 do cromossomo-2, é responsável pelos altos níveis de expressão do citocromo P450, típicos para esta linhagem. Por conseguinte, os cromossomos 1 e 2 das linhagens *mwh* e *flr*³ foram substituídos pelos cromossomos 1 e 2 da linhagem *Oregon R* (R) (FRÖLICH; WÜRGLER, 1989).

1.5.2 Cruzamentos

No SMART são realizados dois tipos de cruzamentos: o padrão, também conhecido como ST – *Standard Cross*, que consiste em fêmeas virgens *flr*³/*ln* (3LR) *TM3*, *ri p^o sep I* (3) *89Aabx*^{34e} e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (GRAF *et al.*, 1989); e, o outro cruzamento, é o de alta bioativação HB - *High Bioactivation Cross* - fêmeas virgens *ORR*; *flr*³/*ln* (3LR) *TM3*, *ri p^o sep I* (3) *89Aabx*^{34e} cruzadas com machos *mwh* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

A partir destes cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseados no marcador *TM3*, *Bd^s*. O fenótipo dos descendentes MH desenvolvem asa normal, com borda lisa (Figura 6), enquanto que no BH, as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada (Figura 7), denominadas *serrate* (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

Os descendentes MH (*mwh* +/ + *flr*³) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que o descendentes BH (*mwh* +/ + *TM3*, *Bd^s*) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3*, *Bd^s*). Os indivíduos MH expressam pelos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr*³. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* que inviabiliza a recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos devido a inversões múltiplas. (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).



Figura 6: Asa borda Lisa



Figura 7: Asa borda serrilhada

Fonte: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, tirada no Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG

De acordo com esses mesmos autores, a linhagem *ORR* é caracterizada por um alto nível de citocromo P450 constitutivo, o que torna o teste SMART mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo. Portanto, para que se tenha a taxa exata de recombinação e mutação a análise dos descendentes BH é de fundamental importância.

1.5.3 Alterações genéticas diagnosticadas através da análise das asas.

O teste da mancha da asa (SMART) baseia-se no fato de que, se ocorrerem alterações genéticas em células do disco imaginal, que estão se dividindo por mitose, estas alterações estarão presentes em todas as células descendentes, induzindo o aparecimento de um clone de células mutantes. A análise é realizada através da observação desses grupos de células, na superfície das asas de moscas adultas, que expressam fenotipicamente os genes marcadores *mwh* ou *flr3*, responsáveis por alterações na forma dos pêlos (GRAF *et al.*, 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

Pêlos mutantes são, a partir daí, classificados em manchas: simples, quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* ou *flr3*, originadas por

mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal, como indica a Figura 8.

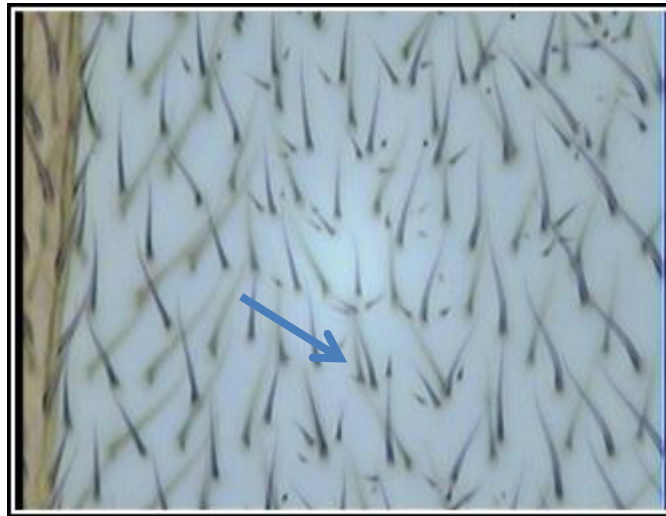


Figura 8: Mancha simples – Tricomas *Mwh* (seta azul)

Fonte: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, tirada no Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG

Manchas gêmeas, quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr*³ na mesma mancha, conforme mostra Figura 9.

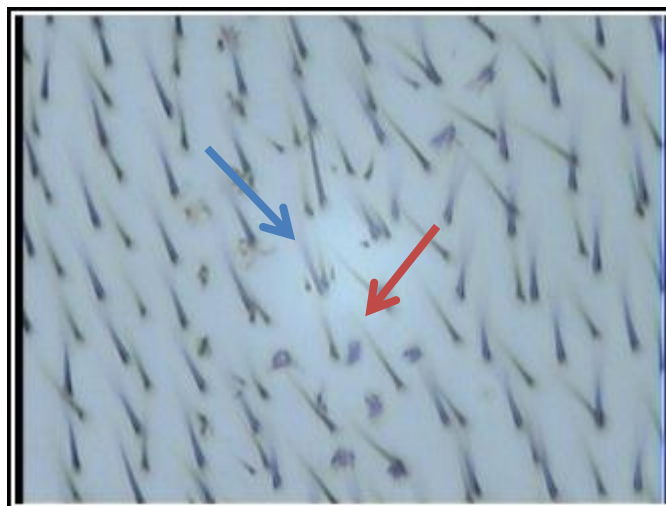


Figura 9: Mancha gêmea – Tricomas *Mwh* (seta azul) e *Flr*³ (seta vermelha)

Fonte: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, tirada no Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG

As manchas ainda são classificadas quanto ao tamanho, podendo ser simples pequenas, quando possuir um ou dois pêlos mutantes, ou simples grandes, se houver mais de dois pelos mutantes. A posição da mancha é determinada de acordo com o setor da asa que tem sete regiões: A, B, C, C', D, D' e E (GRAF *et al.*, 1989). (Figura 10).

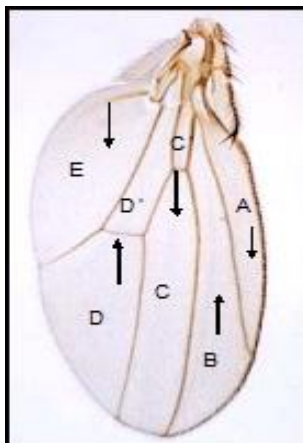


Figura 10: Sequência de Análise da Asa.

Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagenese, UNIPAM, Patos de Minas, MG

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Instituto nacional de câncer: Ações de enfermagem para o controle do câncer uma proposta de integração ensino-serviço. **Fisiopatologia do câncer**. 3. ed. Rio de Janeiro. 2008
- CAVENEY, W.K.; WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Scientific American**, v. 272, p.72-9, 1995.
- COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p.18-24, 2006.
- DANTAS, E. L. R.; SÁ, F. H. de L.; CARVALHO, S. M. de F. de.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M. Genética do Câncer Hereditário. **Câncer Hereditário**, 2009.
- DRESSELHAUS, M., DAI, H. Eds., Carbon Nanotube Special Issue. **MRS 2004** v. 29, 2004.
- EDUCADOR CIÊNCIA. La maravilla de los nanotubos de carbono. 2008. Disponível em: <http://www.ecuadorciencia.org/articulos.asp?id=6025>. Acesso em: 12 jan. 2012.
- FARAJI, A. H., WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorgan. Med. Chem.** v.17, p. 2950-2962, 2009.
- FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 449-455, 2007.
- FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E.; New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 216, p. 179-187, 1989.
- GALIOTTO, A. Avaliação da eficácia do tratamento quimioterápico neoadjuvante em pacientes com câncer de mama avançado do Serviço de Oncologia no Hospital Regina, novo hamburgo – Rs. Dissertação Mestrado, Novo Hamburgo, 37p, 2007.
- GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. As bases farmacológicas da terapêutica. **McGraw Hill Press**, v. 10, p. 1671, 1996.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, 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.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução a Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. de S. Câncer: uma doença genética. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 03, n. 01, p. 4-7, 2008.

GUPTA, A. K. E GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.

GUZMÁN-RICÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH F. M. et al. (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. **Phenunm Press**, New York, p.169-181, 1995.

HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v. 60, p.1638-1649, 2008.

HANS, M. L., LOWMAN, A.M. Nanomaterials Handbook. In : **Nanoparticles for Drug Delivery**. Ed. Taylor & Francis.Estados Unidos, 2006.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's-** the pharmacological basis of therapeutics. 10. ed. New York: McGraw-Hill, P. 2148, 2001.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, 2004.

HIB, J.; ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

JABR-MILANE, L. S., VAN VLERKEN, L. E., YADAV, SUNITA, AMIJI, M. M. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. **Cancer Treat. Ver.** v.34 p. 592-602, 2008.

JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. **BMC Medicine**, v. 8, n. 83, p. 1741, 2010.

JAIN, K. K. Handbook of Nanomedicine. In : **Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology**. Ed. Humana Press. Estados Unidos, 2008.

KAM, N. W. S., O'CONNELL, M., WISDOM, J. A., DAÍ, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v.102(33), p. 11600-1605, 2005.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacol. Ther.**, v.47, n. 2, p. 219-231, 1990.

KISIN, E.R.; MURRAY, A.R.; SARGENT, L.; LOWRY, D.; CHIRILA, M.; SIEGRIST, K.J.; SCHWEGLER-BERRY, D.; LEONARD, S.; CASTRANOVA, V.; FADEEL, B.; KAGAN, V. E.; , SHVEDOVA, A. A. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, p. 1–10, 2011.

KLAINE, S. J.; ALVAREZ, P. J. J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R. D.; LYON, D. Y.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M. J.; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and Effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p.1825–1851, 2008.

LEHMANN, M. **Toxicidade genética das antraciclinas**: associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a topoisomerase II. 2003. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

LIANG, W.; BOCKRATH, M.; PARK, H. Shell filling and exchange coupling in metallic single-walled carbon nanotubes. **Phys Rev Lett.**, v.88, n. 126801, 2000.

LOUIE, S. G. Electronic Properties, Junctions, and Defects of Carbon Nanotubes. **Topics Appl. Phys.**, v. 80, p.113- 145, 2001.

LOURO, I. D.; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; FROES, N. C. **Genética molecular do câncer**. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MARTINS, W. A. DE; SOUZA, V. B. DE; ROCHA, L. F. C.; JUNIOR, H. V. Cardiomiopatia por Doxorubicina em Pacientes com Câncer de Mama – A Propósito de Dois Casos. **Revista Brasileira Cardiologia**, v. 24, n. 3, p. 196-198, 2011.

MORI, L. Mutação e câncer. **Ciência hoje**, v. 30, n. 180. 2002.

NASCIMENTO, R. O. DO. Funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples com calcogênios: preparação de carbono-selênio e tio-nanotubos. Dissertação Mestrado, Santa Maria-Rs, 107 p, 2008.

NEUWALD, E. B. Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina. Dissertação Mestrado, Porto Alegre, 93 p, 2009.

OJOPI, E. P. B.; DIAS NETO, E. **Genômica e oncologia**. In: MIR, L. (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap 19. P. 364-385

OLIVEIRA SÁ, M. P. B. de; GOMES, R. A. F.; SILVA, N. P. C.; OLIVEIRA SÁ, M. V. B. de; CALADO FILHO, I. Cardiotoxicidade e quimioterapia. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 7, p. 326-330, 2009.

PFIZER ITÁLIA S.r.L. ADRIBLASTINA RD: pó liofilizado. Bula de remédio. 2011.

PINTO, L. F. R.; FELZENSWALB, I. **Genética do câncer humano**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.2. p.29-48.

RIETH M. Nano-engineering in scienceandtechnology: na introductiontothe world ofnanodesign. SeriesontheFoundationsof Natural Scinceand Technology, V.6, **World Scientific**, New Jersey, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.1. p.21-27.

ROCHA, A.B.; LOPES,R. M.; SCHWARSTMANN. Natural products in anticancer therapy. Curr. Opin. Pharmacol. v. 1, p. 364-369, 2001.

SANCHEZ, V. C.; PIETRUSKA, J. R; MISELIS N R.; HURT, R. H.; KANE A. B. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? **NIH Public Access**, v.1, n.5, p.511–529, 2009.

SHEKHAR, C. Lean and mean: Nanoparticule based delivery improves performance of cancer drugs. **Chem. Biol.** v.16, p.349-350, 2009.

SHVEDOVA, A.A.; KISIN, E.R.; PORTER, D.; SCHULITE, P.;KAVAN, V.; FADEEL,B.; CASTRANOVA, V. Mechanismos of pulmonary toxicity and medical applicaions of carbon nanotubes: two faces of janus? **Pharmacology e Therapeutics**, v.121, n.2, p. 192-204, 2009.

SILVA, C. E.V; CAMACHO, A. A.; NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CANOLA, J. C. Efeitos cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos do tratamento crônico experimental com doxorubicina em cães. **Ars Veterinaria**, v.20, n.2, p.185-194, 2004.

SINGH, R., LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targetet drug delivery. **Exp. Mol. Pathol.** v.86, p. 215-223, 2009.

SOUZA FILHO, A. G. de,; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1695-1703, 2007.

TALLAJ, J.A.; FRANCO, V.; RAYBURN, B.K.; PINDERSKI, L.; BENZA, R. L.; PAMBOUKIAN, S.; FOLEY, B.; BOURGE. R. C. Response of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy to the Current Management Strategy of Heart Failure. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v .24, n. 12, p. 2196-2201, 2005.

VALADARES, B. L.B.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Inhibitory effect of water extract of própolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1103-1110, 2008.

VOGEL, E. W. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. **Mutagenesis**, v. 2, p. 161-171, 1987.

WEINBERG, R. A. Tumor supressor genes. **Science**, v. 254, p.1138-1145, 1991.

CAPÍTULO II

**Ausência da atividade mutagênica de
nanotubos de carbono de parede
múltipla, funcionalizados, em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

RESUMO

Nanotubos de carbono (NTCs) são moléculas rígidas, flexíveis e resistentes a tensões formadas a partir de folhas de carbono (grafenos), que em altas temperaturas, acabam por se enrolarem, formando tubos de diâmetro nanométrico. Existem diferentes tipos de NTCs, dentre eles podem-se destacar os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) que compreendem um conjunto de nanotubos concêntricos com uma estrutura livre de defeitos. Várias aplicações para este material são sugeridas, incluindo aplicações biológicas como fabricação de biosensores, veiculadores de drogas e vacinas entre outros biomateriais. Contudo, antes que estes materiais possam ser incorporados ao mercado, há a necessidade de se conhecer seus efeitos citotóxicos e genotóxicos. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a mutagenicidade de nanotubos de carbono em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, utilizando o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART). Para tanto, foram utilizadas larvas de 72 horas provenientes do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB), que foram tratadas com soluções contendo diferentes concentrações de NTCPM funcionalizados (0,50, 100, 150, 200, 250 μg / mL). Como controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina DXR (0,4 mM), e como controle negativo água de osmose reversa. As asas dos descendentes trans-heterozigotos (MH) analisados de ambos os cruzamentos ST e HB, não apresentaram resultado significativo sobre a frequência de manchas mutantes quando comparadas com o controle negativo. Desta forma, com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais mencionadas, pode-se concluir que NTCPM não foram mutagênicos para *D. melanogaster*.

Palavras chave: Nanotubos de carbono. Genotóxico. *Drosophila melanogaster*. SMART.

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNTs) are rigid molecules, flexible and resistant to tensions formed from sheets of carbon (graphene), which at high temperature, ultimately to curl, forming nanometer diameter tubes. Among the different types of CNTs, the multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) can be noted for comprising a set of concentric nanotubes with perfect structures and defect-free materials. Several applications for this material are suggested, including biological applications such as manufacturing of biosensors, carriers of drugs and vaccines and other biomaterials. However, before these materials can be incorporated into the market, it is necessary to know their cytotoxic and genotoxic effects. Thus, this study aims to evaluate the mutagenicity of carbon nanotubes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). For this purpose we have used 72-hour larvae from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses. The larvae from both crosses were treated with solutions containing different concentrations of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized (0,50, 100, 150, 200, 250 µg/mL). For positive control, doxorubicin DXR (0,4 mM) was used, and reverse osmosis water for negative control. The descendants trans-heterozygous (MH) analyzed from both ST and HB crosses, had no significant effect on the frequency of mutant spots when compared with negative control (reverse osmosis water). This way, based on the results and on the experimental conditions mentioned in this study, it can be concluded that MWCNTs were not mutagenic for *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Carbon nanotubes. Genotoxic. *Drosophila melanogaster*. SMART

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se destacado como uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos produtos nas mais variadas áreas (HERBST; MACEDO; ROCCO, 2004). Em função do tamanho diminuto das nanoestruturas (RIETH, 2003) a nanotecnologia permite a fabricação, caracterização, manipulação e utilização de materiais com novas propriedades e funções (GUPTA; GUPTA, 2005).

Um dos frutos desse interesse pelo domínio das pequenas dimensões foi a obtenção dos nanotubos de carbono (NTC). Nanoestruturas únicas com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis. São as moléculas mais rígidas, flexíveis e resistentes a tensões que já foram produzidas (KLAINÉ *et al.*, 2008). Podem ser classificados como sistemas unidimensionais, descritos a partir de algumas folhas de grafite (grafeno) dispostas na forma de cilindros concêntricos e fechada em cada extremidade por metade de um fullereno (NASCIMENTO, 2008).

A diversidade das aplicações, reais ou potenciais, dos NTC, assim como a necessidade de controlar as morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente multidisciplinar (HERBST; ROCCO, 2004), atuando em diferentes áreas do conhecimento: como na investigação das propriedades elementares, físicas e químicas, dos nanomateriais; no desenvolvimento de novos métodos de síntese e funcionalização de nanoestruturas; na aplicação de sistemas nanoestruturados em liberação controlada de fármacos; no desenvolvimento de novos dispositivos eletroeletrônicos e nos estudos relacionados à toxicidade potencial desses materiais e dos impactos ambientais ocasionados pelo seu uso (NASCIMENTO 2008).

A indústria farmacêutica tem grande interesse no uso de nanotubos de carbono como transportador molecular (proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas bioativas) com grande seletividade - *drug delivery*. Assim, os NTCs podem atuar como efetivo veículo de agentes terapêuticos no tratamento de várias doenças (MISHRA *et al.*, 2010).

Embora a nanotecnologia tenha crescido rapidamente e as nanopartículas sejam entidades que podem revolucionar a terapia de várias

doenças, (PARVEEN *et al.*, 2012) existe a necessidade de se conhecer os efeitos citotóxicos e genotóxicos, antes que estes materiais possam ser incorporados como veiculadores de drogas e vacinas entre outros biomateriais (KISIN *et al.*, 2011).

Atualmente, inúmeros estudos têm focado nas propriedades genotóxicas de NTCs, mostrando que nanotubos de parede simples (NTCPS), dupla (NTCPD) ou paredes múltiplas (NTCPM) podem induzir danos no DNA, formação de micronúcleos, interrupção do fuso mitótico, e indução de poliplóides (KISIN *et al.*, 2011).

Os dados existentes sobre toxicidade e genotoxicidade de NTCs são ainda limitados e conflitantes e muitos esforços ainda devem ser direcionados a este campo (FRANCHI *et al.*, 2011), mas evidências recentes sugerem pontos de semelhança com fibras de amianto, incluindo um papel para a geração de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e genotoxicidade (SANCHEZ *et al.*, 2009).

Trabalhos conduzidos em relação à toxicidade *in vitro* de NTCPS demonstram que a exposições de culturas de células humanas HaCat (queratinócitos) e células epiteliais dos brônquios a este biomaterial resultaram em geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação de lipídios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e mudanças na morfologia celular (SINGH *et al.*, 2009 *apud* FRANCHI *et al.*, 2011).

Com o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) desenvolvido por Graf *et al.* (1984) é possível detectar um amplo espectro de eventos genotóxicos e antígenotóxicos (GRAF *et al.*, 1984). O teste se baseia no fato de que durante o início do desenvolvimento embrionário da *Drosophila melanogaster*, grupos de células proliferam mitoticamente até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta. Se ocorrer uma alteração genética em uma célula do disco imaginal, esta alteração formará um clone de células mutantes que será detectado como uma mancha de pêlos mutantes, nas asas da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN E GRAF, 1995). A análise dessas manchas expressa fenotipicamente os genes marcadores *flr*³ ou *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pêlos ou tricomas (GRAF *et al.*, 1984).

Diante da variedade de aplicações e o enorme potencial desses nanomateriais, existem igualmente grandes desafios a serem enfrentados, tais como: analisar e comparar a toxicidade potencial e a capacidade para induzir danos no DNA de diferentes nanopartículas. Para sanar esse problema extensas investigações estão em andamento, mas ainda não há um consenso sobre os riscos reais devido os resultados controversos, relacionados especificamente a metodologia de aplicação, a doses e a complexidade dos nanomateriais utilizados. Diante disso, este trabalho torna-se relevante à medida que colabora para este processo de investigação já que objetiva avaliar os nanotubos de parede múltipla, funcionalizados, quanto o seu potencial genotóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados, fornecidos a partir NTC Co. Ltd (Coreia) tratados pelo Instituto de Química UNICAMP Campinas, São Paulo. Empregando a técnica de refluxo e agitação magnética com HNO₃ (6 mol L⁻¹), durante 24 h à 150 ° C. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foram filtrados através de uma membrana 0,2 µm de PTFE e lavados com água deionizada até o filtrado alcançar pH neutro. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas tratados foram secos em sistema de vácuo à temperatura ambiente durante 24 h, e esta amostra foi nomeada NTC-3.

O método de síntese utilizado foi o de deposição química de vapor (CVD), o qual utilizou temperatura de oxidação de 595°C e como fonte de carbono um hidrocarboneto de alta pureza e um metal como catalisador. A pureza dos nanotubos resultantes foi de 98,5%, sendo apenas 1,5% óxido de ferro.

Para o tratamento foram preparadas cinco diferentes concentrações desse produto (50; 100; 150; 200 e 250 µg/mL).

Cloridrato de Doxorubicina (DXR), popularmente conhecido como Doxolen, lote n^o 83520 fabricado por Eurofarma Laboratórios e distribuído pela

Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil. Cada frasco contém 10mg de DXR liofilizado. Possui peso molecular de 580,0 e fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$. Foi utilizado no tratamento na concentração de 0,4mM.

2.2 Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento

Para realização do teste SMART foram utilizadas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça. Foram utilizadas três linhagens: *mwh*, *flr*³ e *ORR*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare-3* (*flr*³, 3-38,8). Os estoques destas linhagens são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura preparado com 820 mL de água, 25 g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana e 1 g de nipagin. São mantidas em uma incubadora B.O.D à temperatura de $\pm 25^{\circ}C$ com umidade relativa do ar de 67% e foto período regulado para 12 horas luz acesa e 12 horas luz apagada.

Foram efetuados dois tipos de cruzamentos para o experimento: Cruzamento Padrão (ST- “Standard Cross”) utilizando fêmeas virgens *flr*³ / *ln* (3LR) *TM3*, *ri pp sep I* (3) 89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^S, cruzadas com machos *mwh/mwh* (FROLICH E WURGLER, 1989); e Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (“HB- High Bioactivation Cross”) cruzando fêmeas virgens *ORR* / *ORR*; *flr*³ / *ln* (3 LR) *TM3*, *ri p*^o *sep I* (3) 89 Aa *bx*^{34e} e *Bd*^S com machos *mwh/mwh* (GRAF *et al.*, 1984).

Tais cruzamentos produziram dois tipos de progênie: indivíduos transheterozigotos para os genes marcadores (MH), e indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 (BH) (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE *et al.*, 2003). Os indivíduos BH diferenciam-se fenotipicamente dos indivíduos MH pela presença de recortes na borda das asas, característica conferida pelo marcador *Bd*^S, deixando-as com aspecto serrilhado (GRAF *et al.*, 1984).

Assim, a análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações gênicas, pequenas mutações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais. A análise dos indivíduos BH permite detectar somente a ocorrência de mutações gênicas e pequenas mutações cromossômicas. Através da comparação dos resultados obtidos nos indivíduos MH com os resultados obtidos nos indivíduos BH pode-se quantificar a real contribuição da recombinação para a genotoxicidade total do composto em estudo (FRANCHI et al., 2008). No entanto, neste trabalho foram analisados somente indivíduos MH.

Os cruzamentos das linhagens foram realizados em massa (100 fêmeas x 50 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para frascos contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 horas. Passadas 72 ± 4 horas do início do período de ovoposição foram coletadas as larvas de terceiro estágio, lavadas com água osmose reversa e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

Estas larvas foram transferidas para frascos de 25 mL contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batatas) e acrescentados 5 mL das diferentes concentrações de nanotubos de carbono (50; 100; 150; 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$). Para controle positivo foi utilizada a doxorubicina (DXR 0,4mM) e para o controle negativo água osmose reversa.

Foi realizado um teste de citotoxicidade, no qual 100 larvas por tubo de tratamento foram expostas às concentrações de nanotubos de carbono testadas. O número de moscas sobreviventes por tratamento fornece uma indicação da toxicidade do composto.

Após sofrer metamorfose, os indivíduos adultos foram transferidos para recipientes contendo etanol 70%, até a montagem das lâminas.

2.2.2 Preparação e análise microscópica das lâminas

Retirando-se as asas das moscas sob microscópio estereoscópico, utilizando um par de pinças entomológicas, as lâminas das asas dos adultos tratados foram montadas em solução de Faure [goma arábica (30 g), glicerol (20

mL), água (50 mL) e hidrato de cloral (50 g)] e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes (GRAF et al., 1984).

A análise dos tricomas, presente na superfície dorsal e ventral das asas, permitiu a identificação de manchas de pêlos mutantes que podem ser classificadas como simples (*mwh* ou *flr3*) ou gêmeas (*mwh* e *flr3*).

Durante a análise microscópica foram registrados o tipo de mancha (simples ou gêmeas), o tamanho (pequenas - com 1-2 células mutantes - ou grandes - com 3 ou mais células mutantes) e a posição onde as manchas foram encontradas.

2.2.3 Análise estatística

Para avaliar a significância estatística dos resultados obtidos, foi realizado o procedimento proposto por Frei e Würzler (1988), uma análise de múltiplas decisões que gera quatro diferentes diagnósticos: positivo, fraco positivo, negativo ou inconclusivo. O teste não paramétrico *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon foi utilizado para excluir resultados falsos positivos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade mutagênica e/ou recombinogênica dos nanotubos de carbono (NTCPM) utilizou-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. O teste SMART é considerado um teste rápido, barato, e que produz resultados confiáveis e altamente reproduzíveis (GRAF et al., 1984). Tem se destacado como um instrumento preciso para discriminar simultaneamente agentes mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos. Além disso, pode ser utilizado para um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas e também partículas gasosas (AMARAL, 2001).

As concentrações utilizadas neste experimento foram baseadas em estudos de clonogenicidade e de viabilidade celular realizado por Franchi et al. (2009). Para avaliar a citotoxicidade das concentrações utilizadas em nosso

estudo, foram contados os indivíduos adultos dos tubos de tratamento com NTCPM. A taxa de sobrevivência verificada em todas as concentrações utilizadas demonstra a ausência de toxicidade das doses testadas.

Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Liu et al. (2009) que detectaram a ausência de toxicidade em um ensaio larval de *Drosophila melanogaster* com nanotubos de carbono. Porém, em doses elevadas (1000 µg/g) foi observado atraso no desenvolvimento larva-adulto, ainda que sem significado estatístico.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos nos experimentos da avaliação mutagênica dos nanotubos de carbono nas concentrações de 50; 100; 150; 200 e 250 µg/mL, controle positivo (DXR 0,4 mM) e controle negativo (água de osmose reversa). Nestas tabelas são encontradas, também, as frequências de manchas mutantes: simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG), gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB).

Os dados evidenciam que o TM observadas nos indivíduos MH do cruzamento ST e HB, tratados com diferentes concentrações de NTCPM, não foram estatisticamente significativos ($P > 0,05$), quando comparadas com a frequência de manchas observadas no controle negativo (Tabelas 1 e 2). Desta forma não se justifica a análise dos indivíduos BH.

É importante ressaltar que mesmo com os altos níveis das enzimas de metabolização do tipo P450, produzidos pela linhagem *ORR/flr*³, não foram observados aumentos estatisticamente significativo nas frequências de manchas, quando foram analisados os indivíduos MH oriundos do cruzamento HB.

Considerando os resultados negativos no TM analisadas nos tratamentos, podemos concluir que os NTCPM foram incapazes de induzir toxicidade genética, relacionada com mutações gênicas, cromossômicas e/ou eventos recombinacionais em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Existem poucos estudos aos quais os resultados encontrados neste trabalho possam ser diretamente comparados. O que se observa na literatura é uma série de resultados divergentes. Em vários estudos específicos conduzidos com NTCs em cultura de células, foi demonstrado que os NTCs exercem um

efeito genotóxico sobre a cultura, induzindo efeitos tóxicos, redução da proliferação celular, alteração da condutividade iônica, peroxidação de lipídios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e mudanças na morfologia celular (SHVEDOVA *et al.*, 2009; SHVEDOVA *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2010). Sugerem também a existência de uma interação direta entre NTCs e o DNA, ou às proteínas relacionadas ao DNA que poderiam levar a danos físicos no material genético (SINGH *et al.*, 2009 apud FRANCHI *et al.*, 2011).

Há que se ressaltar que os NTCs podem conter impurezas metálicas, ou seja, catalisadores usados durante seu crescimento. Estas impurezas podem ser observadas nas extremidades, interior, nas paredes, presas em outras nanoestruturas e no interior de cavidades gráficas, podendo estar ligadas ou não a átomos de carbono. Estes metais podem gerar EROs (espécies reativas de oxigênio) em sistemas biológicos induzindo a um estado de estresse oxidativo, um dos principais efeitos que governam a genotoxicidade de amostras de NTCs (SHVEDOVA *et al.*, 2003).

Embora ensaios de viabilidade celular realizados por alguns pesquisadores tenham detectado que amostras de NTCPs, contendo resíduos de ferro, possuem um alto potencial citotóxico (FRANCHI *et al.*, 2011), as amostras utilizadas de NTCPM do presente estudo, catalisadas com C, O, Fe, não apresentaram citotoxicidade no teste empregado, que pode estar associado ao elevado teor de pureza dos nanotubos utilizados nesse estudo, sendo apenas 1,5% proveniente de óxido de ferro e os outros 98,5% de carbono.

Uma propriedade inerente das nano-partículas relaciona-se a suas características hidrofóbicas, o que leva a acúmulo de aglomerados e a respostas biológicas controversas - já que soluções de NTCs, contendo muitos aglomerados, apresentam respostas genotóxicas negativas. (SINGH *et al.*, 2009). No entanto a funcionalização dos NTC, pode modificar drasticamente suas propriedades, como solubilidade, reatividade e propriedades eletrônicas. Dentre os objetivos da funcionalização de NTC destaca-se o de viabilizar a aplicação de NTC em sistemas que dependem diretamente da neutralização das *interações tubo a tubo*, caracterizadas como interações de Van der Waals, responsáveis pela alta hidrofobicidade destes, o que dificulta a sua aplicação principalmente em meio biológico. Assim, a neutralização dessas forças de interação é decisiva para

a aplicação dos nanotubos em sistemas biológicos pois, para tal finalidade os NTC devem ser solúveis em água para que a sua biocompatibilidade seja estudada (NASCIMENTO, 2008).

Estudos demonstram que os nanotubos quando funcionalizados se apresentam em estado desagregado e resultam em uma menor toxicidade em cultura de células (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A funcionalização torna os NTCs mais biocompatíveis e, portanto, facilita a sua interação com moléculas orgânicas, biológicas ou com outros grupos químicos, como fármacos ou DNA (SINNOLI, 2002). Sendo assim, a ausência da genotoxicidade, verificada em nosso estudo, podem também estar associada ao uso de NTCs funcionalizados.

Poucos estudos têm relatado as interações das nanopartículas com *Drosophila*. Porém, em 2007, Leeuw *et al.* em um estudo realizado com nanotubos de parede simples (NTCPS), utilizando microscopia de fluorescência, avaliaram variações de concentrações de nanotubos entre tecidos de *Drosophila*. Os vídeos construídos a partir de sequências de imagens de fluorescência mostram claramente movimentos peristálticos do sistema digestivo. Observa-se que os nanotubos ingeridos passam através do sistema digestivo, e apenas uma pequena fração, se incorpora aos tecidos. Para determinar se algum dos NTCPS ingeridos atravessou a parede do intestino e penetrou no interior das larvas, tecidos individuais foram removidos, fixados, e analisados para NIR fluorescência e constatado que níveis baixos de fluorescência de nanotubo foram detectados em todos os tecidos examinados.

Estes dados sugerem que a ausência do efeito genotóxico pode estar, também, relacionada à pequena quantidade de nanotubos incorporados aos tecidos. Provavelmente a quantidade que penetrou no núcleo das células do disco imaginal não foi suficiente para causar um efeito genotóxico no organismo testado. No entanto, uma variedade de mecanismos pode influenciar no perfil genotóxico desses nanomateriais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estratégia experimental utilizada neste trabalho permitiu evidenciar a ausência de efeitos genotóxicos dos nanotubos de carbono, funcionalizados, de paredes múltiplas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. No entanto, é importante ressaltar que vários mecanismos interferem nos resultados de toxicidade destes biomateriais como a estrutura, o estado de agregação e o teor de pureza dos NTCs e, principalmente, a funcionalização aplicada, responsável por modificar as propriedades, como solubilidade, reatividade e propriedades eletrônicas. Dessa maneira, outras investigações *in vivo* devem ser realizadas antes de qualquer aplicação clínica e/ou industrial dos NTCs.

Tabela 1- Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de nanotubos de carbono (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL), controle positivo (DXR 0,4mM) e controle negativo (água osmose reversa).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM				
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b								
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2				
mwh/flr ³												
Contr. Neg.	40	0,30	(12)	0,10	(04)	0,05	(02)	0,45	(18)			18
DXR 0,4 mM/mL	60	0,80	(48) +	1,10	(66) +	0,83	(50) +	2,73	(164)	+		154
Nano 50mg/mL	60	0,33	(20) i	0,03	(02) -	0,02	(01) i	0,38	(23)	-		22
Nano 100mg/mL	60	0,40	(24) i	0,07	(04) i	0,00	(00) i	0,47	(28)	-		28
Nano 150mg/mL	60	0,50	(30) i	0,03	(02) -	0,00	(00) i	0,53	(32)	i		32
Nano 200mg/MI	60	0,30	(18) i	0,05	(03) i	0,02	(01) i	0,37	(22)	-		22
Nano 250mg/MI	60	0,43	(26) i	0,08	(05) i	0,02	1 i	0,53	(32)	i		31

m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância □□□ 0,05

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2- Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de nanotubos de carbono (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL), controle positivo (DXR 0,4mM) e controle negativo (água osmose reversa).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
Contr. Neg.	60	0,92	(55)	0,10	(06)	0,05	(03)	1,07	(64)	63
DXR 0,4 mM/mL	60	1,10	(66) -	1,25	(75) +	0,80	(48) +	3,15	(189) +	180
Nano 50 mg/mL	60	0,85	(51) -	0,05	(03) -	0,03	(02) i	0,93	(56) -	55
Nano 100 mg/mL	60	0,85	(51) -	0,03	(02) -	0,00	(00) -	0,88	(53) -	52
Nano 150 mg/mL	60	1,20	(72) -	0,08	(05) i	0,02	(01) i	1,30	(78) -	78
Nano 200 mg/mL	60	1,03	(62) -	0,08	(05) i	0,07	(04) i	1,18	(71) -	71
Nano 250 mg/mL	60	0,97	(58) -	0,12	(07) i	0,02	(01) i	1,10	(76) -	66

m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = 0,05$

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, V. S. Monitoramento do impacto de dejetos industriais em amostras de água do Rio Caí através do teste em *Drosophila melanogaster*. Dissertação de mestrado, Porto Alegre, 74p, 2001.
- ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. **Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster***. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.11. p.281-307.
- FRANCHI, L. P.; GUIMARÃES, N. N.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H. H. R. DE.; CUNHA, K. S. Ausência de efeito tóxico-genético de *morinda citrifolia* (noni) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p.46-53, 2008.
- FRANCHI, L.P.; MATSUBARA, E.Y.; ROSOLEN, J.M.; TAKAHASHI, C.S. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de nanotubos de carbono. 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.
- FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; MATSUBARA, E.Y.; LIMA, J. C.; ROSOLEN, J. M.; TAKAHASHI, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Quim. Nova**, 2011.
- FREI, H.; AND WÜRGLER, F. E.; Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result; **Mutation Res.** 203 p.297-308, 1988.
- FREI, H. AND WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Res.** v.334, p.247-258, 1995.
- FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E.; New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 216, p. 179-187, 1989.
- GRAF, U.; WÜRGLER, 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.
- GUPTA, A. K. E GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.
- GUZMÁN-RICÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH F. M. et al. (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. **Plenum Press**, New York, p.169-181, 1995.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, 2004.

KISIN, E.R.; MURRAY, A.R.; SARGENT, L.; LOWRY, D.; CHIRILA, M.; SIEGRIST, K.J.; SCHWEGLER-BERRY, D.; LEONARD, S.; CASTRANOVA, V.; FADEEL, B.; KAGAN, V. E.; , SHVEDOVA, A. A. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, p. 1–10, 2011.

KLAINE, S. J.; ALVAREZ, P. J. J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R. D.; LYON, D. Y.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M. J.; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and Effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p.1825–1851, 2008.

LEEuw, T. K.; REITH, R. M.; SIMONETTE, R. A.; HARDEN, M. E.; CHERUKURI, P.; TSYBOULSKI, D. A.; BECKINGHAM, K. M.; WEISMAN, R. B. Single-Walled Carbon Nanotubes in the Intact Organism: Near-IR Imaging and Biocompatibility Studies in *Drosophila*. **Nano Letters**, v. 7, no. 9, p. 2650-2654, 2007.

LIU, X.; VINSON, D.; ABT, D.; HURT, R. H.; RAND, D. M. Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in *Drosophila*: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. **Environ Sci Technol.** v.43, no.16, p. 6357–6363, 2009.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; BPHARM.; TIWARI, S.; MPHARM. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p.9–24, 2010.

NASCIMENTO, R. O. DO. Funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples com calcogênios: preparação de carbono-selênio e tio-nanotubos. Dissertação Mestrado, Santa Maria-Rs, 107 p, 2008.

OLIVEIRA, V.; PEREIRA, M. M.; BRANDÃO, H. M.; BRANDÃO, M. A. F. GATTAZ, W. F.; RAPOSO, N. R. B. Nanotubos de carbono aplicados as neurociências: perspectivas e desafios. **Rev Psiq Clín**, 2011.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p.147-166, 2012.

REDDY, A.R.; REDDY, Y.N.; KRISHNA, D.R.; HIMABINDU, V. Multi wall carbono induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells. **Toxicology**, v.272, p.11-16, 2010.

RIETH M. Nano-engineering in scienceandtechnology: na introductiontothe world ofnanodesign. SeriesontheFoundationsof Natural Scienceand Technology, V.6, **World Scientific**, New Jersey, 2003.

SANCHEZ, V. C.; PIETRUSKA, J. R.; MISELIS N R.; HURT, R. H.; KANE, A. B. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? **NIH Public Access**, v.1, n.5, p.511–529, 2009.

SINNOTT, S.B. Chemical functionalization of carbon nanotubos. **J Nanosci Nanotechnol**, v.2, n.2, p.113-123, 2002.

SHVEDOVA, A. A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E. R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A. R.; GANDELSMAN, V. Z.; MAYNARD, A.; BARON, P.; **J. Toxicol. Environ. Health**, v.66, n. 20, 2003.

SHVEDOVA, A. A.; KISIN, E.R.; PORTER, D.; SCHULTE, P.; KAVAN, V. E.; FADEEL, B.; CASTRANOVA, V. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: two faces of janus? *Pharmacology e therapeutics*, v.121, n.2, p. 192-204, 2009.