

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Mecanismos de genotoxicidade de
nanopartículas**

Ana Filomena Aurélio Marques

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2020

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Mecanismos de genotoxicidade de nanopartículas

Ana Filomena Aurélio Marques

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professor Associado com Agregação, Nuno Filipe da
Rocha Guerreiro de Oliveira**

2020

Resumo

Nos últimos anos o uso de nanopartículas ganhou grande destaque em vários ramos distintos, que vão desde o seu uso em biomedicina e cosmética até à sua presença em dispositivos eletrónicos e em engenharia. As suas características distintas de todos os outros materiais demonstraram vantagens que advêm do seu reduzido tamanho. O tamanho destas partículas, que se encontra compreendido na nanoescala, faz com que diversas propriedades físico-químicas destes materiais estejam alteradas em comparação aos seus semelhantes de tamanhos superiores. Para além disso, as suas propriedades únicas podem estar também na origem dos seus efeitos adversos, os quais ainda não se encontram totalmente descritos. Ao fazer uma revisão de vários estudos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*, esta monografia tem como objetivo a discussão de potenciais mecanismos de genotoxicidade induzida por nanopartículas e os seus efeitos adversos nos organismos. Também se pretende analisar os diferentes estudos que investigam fenómenos de genotoxicidade, as suas limitações e estratégias para as ultrapassar.

Os resultados obtidos desta pesquisa demonstram que ainda existe um longo caminho a percorrer no que diz respeito ao estudo da genotoxicidade e dos mecanismos associados à mesma para os nanomateriais. Existem resultados contraditórios tanto para o mesmo tipo de ensaios (*in vitro* vs *in vivo*) como na extrapolação de ensaios *in vitro* para organismos *in vivo*. Os mecanismos mais apontados na literatura como responsáveis pelos efeitos genotóxicos das nanopartículas, para além da genotoxicidade primária, apontam para modos de ação indiretos, como é o caso de *stress* oxidativo com a produção de espécies reativas de oxigénio, processos inflamatórios, perturbação do ciclo celular e interações com substâncias antioxidantes.

Em resumo, é necessária uma maior e melhor caracterização das nanopartículas e a condução de estudos mais fidedignos, nos quais haja uma adaptação metodológica adequada a estas nanopartículas. Neste sentido poderá ser obtida mais informação sobre a genotoxicidade a qual poderá ser comparada e usada numa avaliação correta do risco inerente da sua utilização, cada vez mais ampla. É necessária também a elaboração de mais normas para o estudo de nanopartículas, devido às suas particularidades distintas de qualquer outro material.

Palavras-chave: nanopartículas, stress oxidativo, inflamação, nanogenotoxicidade, dano no DNA.

Abstract

In recent years, the use of nanoparticles has gained great prominence in several different areas, ranging from its use in biomedicine and cosmetics to its presence in electronic devices and engineering. Its distinctive features have shown advantages, due to its small size. Their size on the nanoscale, causes the physical and chemical properties of these materials to change compared to their larger counterparts. However, their unique properties can also be the source of their adverse effects, which are not yet fully described. By reviewing several *in vitro* and *in vivo* genotoxic studies, this work aims to discuss the mechanisms of genotoxicity induced by nanoparticles and their adverse effects on organisms. It's also intended to analyse the different studies that investigate genotoxicity, their limitations, and strategies to overcome them. The results obtained from this research show that there is still a long way to go regarding the study of genotoxicity and the mechanisms associated. There are conflicting results both within the same type of assays (*in vitro* vs *in vivo*) as in the extrapolation of *in vitro* assay for *in vivo* organisms. The most pointed mechanisms in the literature as responsible for the genotoxic effects of nanoparticles, in addition to primary genotoxicity, point to indirect modes of action, such as the case of oxidative stress with the production of reactive oxygen species, inflammatory processes, disturbance of the cell cycle and interactions with antioxidant substances.

In summary, a greater and better characterization of the nanoparticles and the conduct of more reliable studies are necessary, in which there is a methodological adjustment appropriate to the materials. In this sense, more information on genotoxicity can be obtained and used in a correct assessment of the inherent risk of its increasingly broad use. It is also necessary to develop specific standards for the study of nanoparticles, due to their peculiarities distinct from any other material.

Key-words: Nanoparticle, oxidative stress, inflammation, nanogenotoxicity, DNA damage

Agradecimentos

A realização desta monografia e a concretização desta etapa só foi possível graças à colaboração e apoio, direta ou indiretamente, de várias pessoas, às quais gostaria muito de agradecer:

Ao prof. Doutor Nuno Oliveira, pela disponibilidade para orientar esta monografia. Obrigada pela exigência, pelos comentários e sugestões dispensadas ao longo do tempo, e pela sua paciência que tornou possível a concretização deste trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais e à minha tia, pelo esforço que fizeram ao longo destes anos e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Ao Gonçalo, pela paciência e compreensão que teve pelo tempo que não pude estar presente.

A todas as pessoas que ao longo destes anos, partilharam comigo este percurso, do primeiro ano até ao último, e estiveram presentes nos melhores e nos piores momentos: Inês Mingates, Catarina Graço, Mara, Teresa, Alexandre, Olesea, Filipa, Sofia Rocha. Obrigada pelo apoio incondicional e pelas memórias que guardarei com muito carinho.

Por último, agradeço a todos que, mesmo não sendo aqui mencionados, acreditaram que era possível.

O meu mais sincero obrigada.

Abreviaturas

CA - Aberrações cromossómicas

CBMN - Ensaio do micronúcleo em células com a citocinese bloqueada

DSB - Quebras na dupla cadeia (“Double strand breaks”)

DWCNT – Nanotubos de carbono de parede dupla (“Double-walled carbon nanotubes”)

FDA – Food and Drug Administration

GSH - Glutathiona

HPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

ICH - Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano

ISO - Organização Internacional de Normalização

MDA - Malondialdeído

MN – Micronúcleos

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (“Multi-walled carbon nanotubes”)

NLC – Transportadores de lípidos nanoestruturados (“Nanostructured lipid carries”)

NP – Nanopartículas

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

QDs- Pontos quânticos (“Quantum dots”)

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SCE - Trocas entre cromatídes irmãs

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SLN – Nanopartículas de lípidos sólidos (“Solid lipid nanoparticles”)

SWCNT – Nanotubos de carbono de parede única (“Single-walled carbon nanotubes”)

UDS - Síntese não programada de DNA

Índice

| | |
|---|----|
| Resumo | 4 |
| Abstract | 5 |
| Agradecimentos | 6 |
| Abreviaturas | 7 |
| Introdução | 10 |
| Metodologia..... | 11 |
| Tipos de nanopartículas | 12 |
| a) Nanopartículas de carbono | 12 |
| b) Nanopartículas de cerâmica..... | 12 |
| c) Nanopartículas metálicas | 13 |
| d) Nanopartículas lipídicas | 13 |
| e) Nanopartículas poliméricas | 14 |
| f) Pontos quânticos | 14 |
| Genotoxicidade, ensaio e limitações | 15 |
| a) Ensaio do cometa | 17 |
| b) Teste de Ames | 17 |
| c) Ensaio do micronúcleo | 18 |
| d) Testes das aberrações cromossômicas | 19 |
| e) Ensaio de mutação no gene HPRT em células de mamíferos | 19 |
| f) Ensaio γ -H2AX | 20 |
| Mecanismos de genotoxicidade | 21 |
| Conclusão | 34 |
| Referências Bibliográficas | 34 |

Índice de Figuras:

Figura 1. Esquemas dos vários tipos de nanopartículas15

Figura 2. Esquemas dos possíveis mecanismos de genotoxicidade induzida por nanopartículas33

Índice de Tabelas:

Tabela 1. Estudos de genotoxicidade *in vitro*21

Tabela 2. Estudos de genotoxicidade *in vivo*26

Introdução

Durante as últimas décadas, o ramo da nanotecnologia teve um grande desenvolvimento, com o aparecimento de diferentes tipos de nanomateriais com uma vasta diversidade de tamanhos e formas, e assim, um grande potencial de aplicação em áreas variadas. Atualmente já podemos encontrar nanopartículas numa vasta gama de produtos, como em cosméticos, na engenharia, dispositivos eletrónicos, aditivos alimentares, entre outros (1). Na área da biomedicina já se utilizam este tipo de partículas em terapias génicas, na terapêutica contra o cancro com o intuito de melhorar o direcionamento ao local do tumor, usando nanopartículas radioisotópicas, entre outros (2,3).

Em 1995 foi aprovado o primeiro nanomedicamento pela FDA, uma formulação lipossómica de doxorubicina (nome comercial Doxil) para o tratamento de alguns tipos de cancro, que incluem cancro do ovário e sarcoma de Kaposi associado a SIDA. Este nanomedicamento revelou-se vantajoso pois, devido à sua formulação em lipossomas de reduzidas dimensões foi possível diminuir a cardiotoxicidade da substância ativa (3). Estudos indicam que a indústria mundial de nanotecnologia poderá vir a atingir 75,8 mil milhões de dólares em 2020 e que as vendas globais de nanopartículas de metal atinjam os 120 mil milhões de dólares em 2025 (4,5).

De acordo com critérios da União Europeia, um nanomaterial é definido como “um material natural, incidental ou fabricado, que contenha partículas num estado não ligado ou como um agregado ou um aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas na distribuição numérica, uma ou mais dimensões externas estejam na faixa de dimensões entre 1nm a 100nm. Em casos específicos e quando justificado por preocupações com o meio ambiente, a saúde, a segurança ou a competitividade, o limite de distribuição de tamanho numérico de 50% pode ser substituído por um limite entre 1% a 50%” (6). Contudo, é de notar que podem existir outras definições ligeiramente diferentes, uma das quais a da Organização Internacional de Normalização (ISO), que define nanopartícula como “Nano-objeto com todas as dimensões externas na nanoescala, onde os comprimentos dos eixos mais longos e mais curto do nano-objeto não difiram significativamente.” (7)

As nanopartículas exibem um conjunto de propriedades físico-químicas bastante diferentes comparativamente a partículas de tamanho superior da mesma substância. O facto da sua dimensão estar compreendida entre 1-100 nm faz com que exista uma interação diferente com as células e, conseqüentemente, uma alta capacidade de penetração celular, visto que as células humanas típicas mais pequenas rondam os 7 μm (2). A redução do tamanho destes materiais também vai alterar as propriedades de superfície das mesmas, uma vez que os átomos se encontram mais à superfície das partículas, aumentando a reatividade.

Assim sendo, propriedades elétricas, magnéticas, morfológicas e químicas poderão estar alteradas em materiais reduzidos à nanoescala (8).

À medida que a sua utilização vai sendo cada vez mais generalizada, a importância do estudo da toxicidade das várias nanopartículas e dos seus riscos para a saúde humana e para o ambiente aumentam. Para a realização destes estudos é importante a correta caracterização física e química das nanopartículas. O estudo adequado dos mecanismos gerais de toxicidade devem ser investigados tendo em conta diversos *endpoints* distintos, que podem ir desde a habilidade de estimulação de espécies reativas de oxigénio (“Reactive Oxygen Species”, ROS) que levam a *stress* oxidativo, como à capacidade destas nanopartículas serem mais facilmente internalizadas pelas células (9). As diferentes vias de exposição (e.g. pele, pulmões e trato gastrointestinal), a sua capacidade ou não de deposição nos vários órgãos e a capacidade de eliminação dos mesmos são diferentes fatores que podem influenciar a ocorrência de efeitos adversos associado ao uso de nanopartículas (10).

A genotoxicidade é uma das preocupações associadas ao uso de nanopartículas. É definida como a capacidade que um agente químico ou físico possui para lesar o material genético, afetando assim a integridade da célula. Devido ao facto de as nanopartículas serem relativamente recentes, a informação sobre a genotoxicidade e os seus mecanismos subjacentes não se encontra muito bem esclarecida. Esta monografia tem como objetivo descrever os principais tipos de nanopartículas e rever os mecanismos de genotoxicidade descritos, com base em diversos estudos relatados na literatura, discutindo também as metodologias e estratégias usadas para avaliar este tipo de toxicidade. Pretende-se também abordar as diferentes limitações dos estudos que investigam a genotoxicidade das nanopartículas e a forma de ultrapassar as lacunas atuais neste tipo de estudos.

Metodologia

Tendo em conta os objetivos desta monografia foi realizada uma pesquisa entre Julho de 2019 e Setembro de 2020, com recurso às bases de dados bibliográficas Pubmed, ScienceDirect, Google Scholar e B-on. Os descritores utilizados nesta pesquisa foram “genotoxicity”, “nanoparticles”, “mechanism” e “nanogenotoxicity”. Estes termos gerais foram utilizados com outras palavras-chave mais específicas, de forma a completar melhor a pesquisa, como “quantum dots”, “nanotubes”, “DNA damage”, “gene”, “oxidative stress”, entre outros. Estes termos foram utilizados separadamente ou em combinação. Foram selecionados apenas artigos científicos escritos em inglês e os critérios de seleção basearam-se na relevância do seu conteúdo. Foram utilizados nesta pesquisa tanto artigos de revisão como estudos clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Para além desta pesquisa bibliográfica foram também consultados manuais de referência como os livros “Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts” da autoria da P.K. Gupta e “Casarett and Doull’s Toxicology The Basic Science of Poisons” (6º edição), para uma melhor compreensão da genotoxicidade como um todo.

Tipos de nanopartículas

A classificação das nanopartículas em várias categorias tem em conta as suas diferentes características, como o tamanho, morfologia e propriedades químicas e físicas. Essa classificação pode também ser útil nos posteriores estudos de toxicidade. Na Figura 1 pode ser encontrado um esquema geral dos vários tipo de nanopartículas, que vão ser explicadas de seguida.

- a) *Nanomateriais de Carbono*. Dentro desta categoria estão incluídos os fulerenos e os nanotubos. Os fulerenos são compostos alótropos de carbono, caracterizados pela sua estrutura poligonal composta por 60 ou mais átomos de carbono (11). Devido à sua estrutura única, que possui eletrões orbitais π -moleculares deslocalizados, estes compostos podem ter uma função antioxidante que poderá ser útil no tratamento de patologias como doenças neurodegenerativas ou cancro, e também como forma de transporte de fármacos (12). Os nanotubos de carbono apresentam-se estruturalmente como uma folha de grafite enrolada sobre si, em forma de cilindro (10). Existem diferentes tipos de nanotubos, consoante a quantidade de folhas de grafite que possuem; se apresentarem uma única folha são designados SWNT (“single-walled”), se possuírem duas folhas são designados por DWNTs (“double-walled”) ou MWNTs (“multi-walled”), caso tenham várias folhas de grafite (13). A sua condutividade elétrica e térmica, bem como as suas propriedades mecânicas são algumas das características que possuem para a sua aplicação na área terapêutica (14).

- b) *Nanopartículas de cerâmica*. Estas nanopartículas são caracterizadas por serem sistemas com compostos inorgânicos, tais como a sílica ou o alumínio, com características porosas (10). Têm como vantagem serem altamente resistentes a alterações ambientais e são também mais resistentes à degradação e à desgranulação devido à sua natureza porosa (15). Estas nanopartículas são estáveis na presença de alterações do pH, podendo ser usadas na proteção de diversas biomoléculas, tais como enzimas, protegendo-as assim da desnaturação causada pelo pH e também pela temperatura (16). A sílica e o alumínio, usados neste tipo de nanopartículas são geralmente compatíveis com os sistemas biológicos. No entanto,

a sua biodegradação é muito lenta e a sua remoção do organismo é assim dificultada (17).

- c) *Nanopartículas metálicas e óxidos metálicos*. Estas nanopartículas são formadas exclusivamente por precursores de metais (13). O seu interesse advém das suas características óticas e elétricas únicas, propriedades catalíticas e reatividade química, que faz com que sejam utilizados em sensores, imagiologia biológica e em bioensaios (18). Cobre, prata ou ouro são alguns exemplos de metais utilizados em nanopartículas, sendo o ouro dos mais utilizados devido às suas diversas vantagens, como a biocompatibilidade, pouca toxicidade e facilidade de síntese (16). As características óticas únicas das nanopartículas de ouro devem-se à ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR), que consiste num processo em que os eletrões de ouro reagem com a radiação recebida, absorvendo e espalhando luz. Este processo pode ser utilizado para obter um aquecimento localizado com o objetivo de destruir células ou para a libertação de fármacos (19). As nanopartículas de prata são utilizadas devido às suas características antibacterianas no revestimento de cateteres e em pensos, enquanto as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) são bastante utilizadas em produtos para proteção solar (20).
- d) *Nanopartículas lipídicas*. Estas nanopartículas são geralmente esféricas e possuem um núcleo contendo lípidos e uma matriz de moléculas lipofílicas solúveis, que poderá ser estabilizada com o uso de surfactantes ou emulsificantes (13). A sua semelhança com as membranas biológicas torna o seu uso atrativo tal como a sua natureza anfipática (21). Recentemente tem havido um crescente interesse em dois tipos destas nanopartículas: SLN (“Solid lipid nanoparticles”) e NLC (“nanostructured lipid carriers”). Os SLN têm uma estrutura composta por um núcleo sólido de lípidos, o qual pode conter triglicéridos, misturas de glicerídeos ou ceras sólidas tanto à temperatura ambiente como à temperatura do corpo humano. Devido ao seu núcleo sólido a mobilidade do fármaco diminui comparativamente às alternativas que possuem núcleo líquido, o que vai aumentar a libertação controlada dos fármacos. Nos NLC, a matriz lipídica vai possuir uma estrutura cristalina imperfeita ou amorfa, o que possibilita que a substância ativa possa ser introduzida em várias formas, permitindo assim uma maior capacidade de carga para vários compostos e menor potencial de expulsão de compostos ativos (22).
- e) *Nanopartículas poliméricas*. São nanopartículas compostas por uma repetição de unidades organizadas em forma de cadeia, que poderá apresentar uma variedade de

composições e estruturas (17). Esta designação está associada a um vasto leque de diferentes nanopartículas, sendo que as principais podem ser consideradas as nanocápsulas e nanoesferas. Relativamente às primeiras, as substâncias ativas estão contidas dentro de um núcleo aquoso ou não aquoso, o qual é encapsulado por um involucro polimérico. No caso das nanoesferas, o composto ativo e o polímero estão uniformemente dispersos (23).

- f) *Pontos quânticos (QDs, Quantum Dots)*. Os pontos quânticos foram descritos pela primeira vez por Ekimov e Onushenko em 1981 e tiveram a sua primeira aplicação em 1998, em imagiologia biológica (24). São nanocristais semicondutores com fluorescência constituídos por elementos pertencentes aos Grupos 12 a 16 da tabela periódica (25). Estruturalmente possuem um núcleo cristalino metaloide, que pode ser composto por materiais como o cádmio-selénio, cádmio-telúrio, entre outros. Podem ser revertidos ou cobertos com materiais biocompatíveis ou camadas de polímeros de forma a aumentar a solubilidade em água e a sua bioatividade (26). Uma das características que torna interessante o uso dos pontos quânticos é a capacidade da sua banda de emissão poder estar em vários locais do espectro ótico, desde o UV ao infravermelho, dependendo da composição química e dimensão (25). As propriedades luminescentes sob a luz UV vão ser controladas pelo tamanho dos pontos quânticos em que, por exemplo, pontos quânticos na ordem dos 2 nm vão exibir fluorescência verde brilhante, enquanto que com 5 nm de tamanho exibem vermelho. Quanto menor for a dimensão dos pontos quânticos, menor o comprimento de onde que emitem (26). Tradicionalmente o cádmio é o principal elemento dos pontos quânticos. No entanto, é conhecida a citotoxicidade induzida por este elemento, complicando assim a sua utilização *in vivo*. Para ultrapassar este obstáculo e de forma a aproveitar as suas funcionalidades foram desenvolvidos pontos quânticos que contêm silício, carbono e de grafeno, permitindo assim o uso, por exemplo, em sondas e biossensores (25). Uma aplicação emergente dos pontos quânticos é como transportador rastreável de fármacos, podendo assim dar informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica de substâncias novas com interesse farmacológico (25).

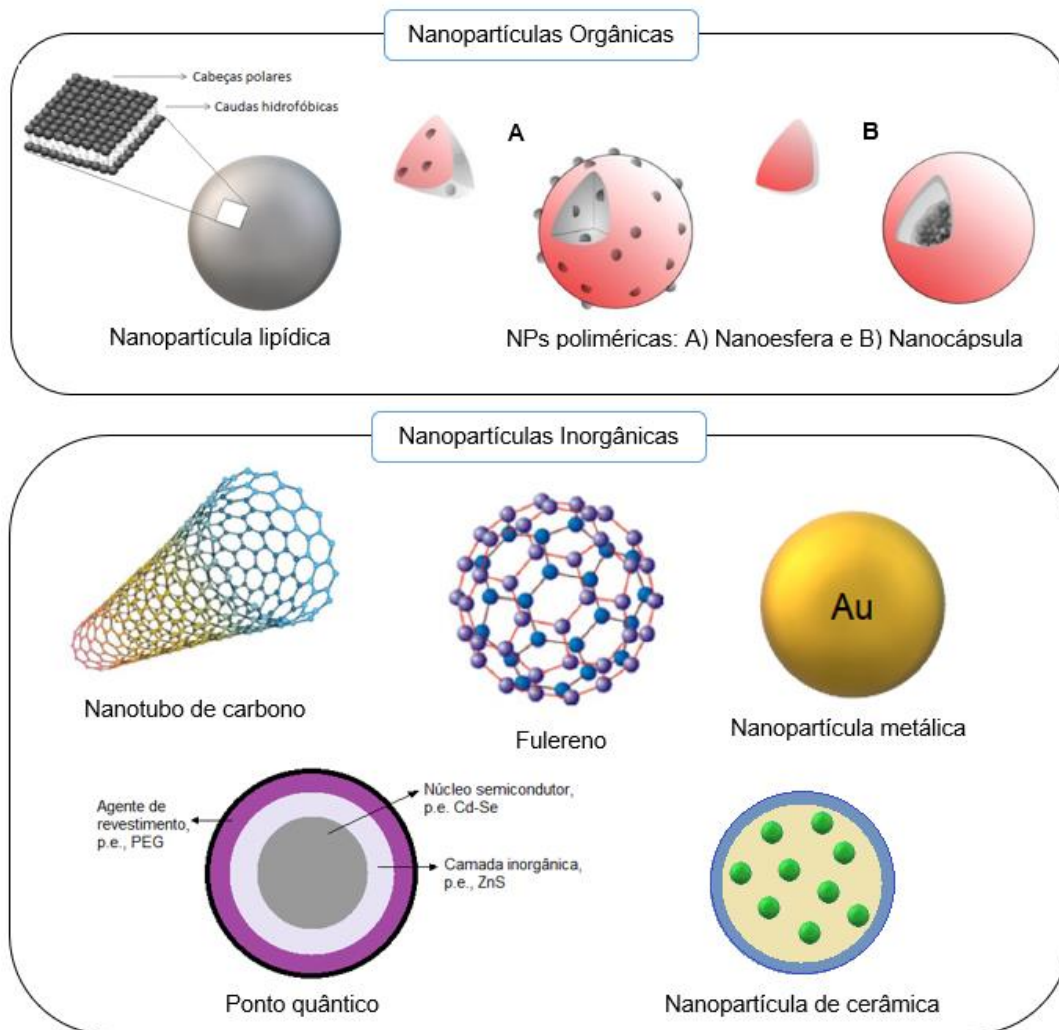


Figura 1. Esquema de vários tipos de nanopartículas. Adaptado de: 14,21,23,26,27.

Genotoxicidade, ensaios e limitações

A Toxicologia Genética é o ramo da Toxicologia que se dedica ao estudo dos efeitos de agentes químicos e físicos sobre o material genético e nos processos genéticos das células vivas. Nestes efeitos nocivos incluem-se as lesões de DNA que podem ser responsáveis pelo aparecimento de cancro (células somáticas) e também alterações no DNA que podem ser herdadas e transmitidas de uma geração para a seguinte (células germinativas) (28). O conceito de genotoxicidade pode ser frequentemente confundido com o de mutagenicidade. Todas as substâncias mutagénicas são genotóxicas: No entanto, nem todos os agentes genotóxicos são efetivamente mutagénicos, visto que genotoxicidade abrange um leque maior de *endpoints*. As mutações correspondem a alterações irreversíveis na sequência nucleotídica transmissíveis à descendência celular (caso ocorram em células somáticas) ou

entre gerações de indivíduos (se ocorrerem em células germinativas). No entanto, o conceito de genotoxicidade engloba isso mas também outros processos não transmissíveis como sejam o caso da síntese não programada de DNA (UDS), quebras nas cadeias de DNA e trocas entre cromátides-irmãs (SCE) (28).

Para a determinação da existência ou não de genotoxicidade por parte de nanopartículas existem normas a ter em conta para os ensaios que se vão realizar. Para uniformizar e garantir parâmetros de qualidade apropriados, a ICH (“International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use”) desenvolveu uma norma reguladora com o objetivo de guiar a realização dos diferentes ensaios e a interpretação de resultados, melhorando assim a caracterização dos riscos para efeitos carcinogénicos: a *guideline* ICH S2. Esta norma define os testes de curto termo de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* usados para identificar compostos que induzam lesão genética por diversos mecanismos (29). Para uma boa caracterização do potencial genotóxico é necessária a realização de uma bateria de ensaios distintos com diferentes *endpoints* toxicológicos de forma a averiguar diversos mecanismos envolvidos. Um bom desenho experimental é essencial pois os resultados obtidos podem depender do tipo de célula usada, do tempo de exposição, da concentração/dose e do tipo de ensaio efetuado (30).

Apesar do leque de ensaios disponíveis para a deteção de genotoxicidade existem ainda alguns desafios que podem comprometer a interpretação correta dos resultados obtidos. A variabilidade nos nanomateriais usados nos estudos é uma delas, existindo inconsistências de lote para lote relativamente a características como o tamanho, forma e propriedades de superfície, ou mesmo descrições na rotulagem incorretas. Outros fatores limitativos são as dificuldades na deteção e quantificação dos nanomateriais nos tecidos e as possíveis alterações nas propriedades físicas e químicas das nanopartículas com o decorrer do tempo ou com o ambiente biológico em que se encontram (3).

Outra limitação no estudo dos efeitos genotóxicos das nanopartículas deriva do facto das *guidelines* existentes para os diversos ensaios de genotoxicidade (OCDE, por exemplo) serem concebidas para testar substâncias químicas, ou seja, a sua aplicabilidade às nanopartículas propriamente ditas não pode ser dada como garantida pois, como já foi referido, as suas propriedades físico-químicas são diferentes dos seus similares de maiores dimensões e isso pode influenciar as interações com o DNA (31).

A caracterização mínima das nanopartículas para a realização de ensaios toxicológicos é recomendada, bem como a descrição do tamanho das partículas e a forma, o estado de agregação ou aglomeração, a composição geral e da superfície, níveis de pureza, área e carga de superfície e reatividade da superfície. Outros fatores importantes a ter em conta

na caracterização dos nanomateriais é a sua estabilidade e interação com os meios que vão ser utilizados, o qual vai depender do efeito de várias forças (forças de *Van der Waals*, impedimento estérico e forças magnéticas) (32).

A internalização das nanopartículas nas células também pode influenciar as conclusões de um estudo. No caso de um estudo que demonstre que a nanopartícula não foi internalizada pela célula isso não implica automaticamente que esta não seja tóxica, uma vez que pode haver ação indireta da nanopartícula, nomeadamente por *stress* oxidativo ou fenómenos de inflamação. De maneira a realizar uma correta avaliação dos riscos genotóxicos é necessário uma bateria de ensaios de forma a cobrir os *endpoints* mais importantes e os diferentes mecanismos (30). Os ensaios mais comuns estão descritos de seguida:

- a) *Ensaio do cometa (Comet Assay)*. Este teste é dos mais utilizados para avaliar o risco potencial genotóxico de diversos agentes devido à sua simplicidade, sensibilidade e acessibilidade. É um método que mede as quebras de DNA em células eucarióticas, sendo também chamado de ensaio de eletroforese em gel de célula única (33). Inicialmente as células são incorporadas em agarose numa lâmina de vidro e posteriormente lisadas, utilizando um alto teor de sal e detergente, de forma a eliminar componentes celulares solúveis, histonas e membranas. As quebras que ocorreram no DNA relaxam a estrutura superenrolada, sendo este capaz de se estender no decorrer da eletroforese. O ensaio é normalmente realizado a valores de pH alto. Nestas condições, formam-se estruturas semelhantes a uma cauda de cometa, as quais são observadas por microscopia de fluorescência. A intensidade da cauda do cometa observada é proporcional ao número de quebras de DNA (34). Aquando do tratamento com agarose e de forma a detetar lesões oxidativas do DNA, as células podem ainda ser tratadas com nucleases, tais como a endonuclease III (Endo III), a formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) ou a 8-hidroxiguanina DNA-glicosilase, com o objetivo de gerar quebras secundárias (33). Este ensaio pode ser aplicado a várias situações, incluindo na avaliação da genotoxicidade de novos compostos químicos, na monitorização da contaminação ambiental, na biomonitorização de populações humanas e na investigação fundamental sobre lesão e reparação do DNA (35).
- b) *Teste de Ames*. Este ensaio é utilizado habitualmente numa fase inicial da determinação do potencial mutagénico de agentes e é vocacionado para identificar mutações reversas (33). Neste ensaio vamos ter colónias de *Salmonella typhimurium* que não possuem a capacidade de sintetizar o aminoácido essencial histidina

(auxotróficas), as quais em contacto com um agente mutagénico, vão adquirir uma mutação que induz a produção desse aminoácido. As colónias que adquirem a capacidade de produção do aminoácido essencial vão ter a designação de “colónias revertentes” (35,36). Para este ensaio são recomendadas estirpes onde se possam detetar substituições de bases e mutações por desfasamento (“frameshift”), como é o caso das estirpes de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 (29). A mutagenicidade da substância em estudo vai ser diretamente medida pelo número de colónias revertentes (34). Como é sabido, muitos mutagénicos e/ou cancerígenos necessitam de ativação metabólica para que os seus efeitos ocorram. Neste sentido, os protocolos do teste de Ames incluem também o S9-mix, uma mistura contendo o homogenato de fígado de rato, muito rico em enzimas da família citocromo P450 (fase I) (37). Pode haver limitações neste teste para o estudo de nanopartículas, visto que nanopartículas de maiores dimensões podem não conseguir atravessar a parede celular ou, se conseguirem entrar na célula, podem interferir na síntese de histidina e assim induzir falsos negativos ou positivos (31).

- c) *Ensaio do micronúcleo (MN)*. A simplicidade e a aplicabilidade deste teste a uma variedade de diferentes tipos de células faz com que tenha vindo a tornar-se uma ferramenta bastante utilizada na determinação de genotoxicidade. Para existir a formação de MN é necessário a ocorrência de quebras no cromossoma (i.e. eventos clastogénicos) ou, por outro lado, da ocorrência de perturbações nos mecanismos de segregação cromossómica originando alterações numéricas de cromossomas (i.e. eventos aneugénicos). Para este ensaio, é necessário que seja avaliada a ocorrência da divisão celular na presença da substância em estudo (38). Em testes de genotoxicidade *in vitro*, as células podem ser incubadas com citocalasina B, que é um inibidor da polimerização da actina, interferindo na formação do anel contráctil que restringe o citoplasma entre os núcleos durante a citocinese (36). A citocalasina B, adicionada antes da ocorrência da mitose, vai resultar em células binucleadas, permitindo assim a identificação e análise de MN exclusivamente nas células que concluíram uma mitose. Este ensaio denomina-se ensaio do micronúcleo em células com a citocinese bloqueada (CBMN). Segundo as *guidelines* da OCDE, este ensaio requer uma fonte exógena para ativação metabólica, no caso das células utilizadas não serem metabolicamente competentes. Caso estejamos perante um ensaio *in vitro*, este sistema de ativação metabólica exógena não vai mimetizar plenamente as condições *in vivo*. É necessário também a adoção de medidas de modo a evitar artefactos e possíveis resultados positivos em termos de MN, devido a alterações de pH ou osmolaridade ou interações com o meio de cultura celular, entre outros (39).

Nos estudos que têm como objetivo a avaliação de nanopartículas esta abordagem comum do ensaio CBMN pode não ser a mais adequada. Estudos demonstram que a citocalasina B pode impedir a captação celular de nanomateriais, devido ao facto de interferir na formação dos filamentos de actina necessários para a endocitose. Para evitar que isto aconteça, as células devem ser expostas às nanopartículas em estudo e, numa só numa etapa posterior ser aplicada a citocalasina B (40). Este ensaio pode também ser realizado *in vivo* designando-se de teste do micronúcleo em eritrócitos policromatófilos de mamífero. Para além de servir para avaliar a genotoxicidade de uma substância é também usado para confirmar e investigar com mais detalhe genotoxicidade detetada em ensaios *in vitro*. É avaliada a formação de micronúcleos em amostras de eritrócitos da medula óssea ou em reticulócitos, normalmente de roedores (41).

- d) *Teste das aberrações cromossómicas (CAs)*. Este ensaio tem como objetivo a identificação de substâncias que podem causar aberrações cromossómicas estruturais em culturas celulares de mamíferos (36). Estas alterações resultam de falhas nos processos de reparação do DNA, em que as quebras que tenham ocorrido nos cromossomas não sejam reparadas ou o sejam numa configuração errada (35). As aberrações cromossómicas estruturais podem ocorrer tanto numa cromátide (i.e. aberrações do tipo cromatídico) ou em ambas (i.e. aberrações do tipo cromossómico), sendo mais habituais as cromatídicas (42). Para a análise das células em cultura estas têm de estar em metáfase. Após exposição da cultura ao composto químico em estudo as células são tratadas com uma substância que vai parar a progressão da mitose durante a metáfase, como por exemplo a colchicina. Após tratamento hipotónico adequado e coloração as células em metáfase vão ser analisadas ao microscópio (43). Este ensaio pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo* (42,43). No entanto, este teste tem vindo a ser cada vez menos utilizado e substituído pelo teste do MN, devido ao facto de ser mais demorado e de não detetar eventos aneugénicos (40).
- e) *Ensaio de mutação no gene HPRT em células de mamíferos*. O ensaio de mutação no gene *HPRT in vitro* tem como objetivo detetar mutações nos genes induzidos por agentes químicos (33). As linhas celulares que aqui são utilizadas avaliam a formação de mutações diretas nos genes repórter, nomeadamente o gene endógeno designado por HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferase), localizado no cromossoma X. O princípio deste ensaio baseia-se na sensibilidade das células ao análogo da purina 6-tioguanina (TG). As células mutadas deficientes na atividade da enzima Hprt vão ser resistentes aos efeitos citostáticos do TG e, assim, vão ser capazes de proliferar na

presença deste. Pelo contrário, as células normais que contêm a enzima Hprt são sensíveis ao TG, que causa a inibição do metabolismo celular e vai interromper a divisão celular, não sendo capazes de proliferar (44). Neste ensaio podem ser utilizadas várias linhas celulares, desde células de linfoma de rato L5178Y, células de ovário de hamster chinês e também células humanas, desde que sejam do sexo masculino, como MCL-5 e TK6 (40). Como o gene alvo deste ensaio é codificado no cromossoma X dos mamíferos e os machos são heterogaméticos para os cromossomas sexuais, é relativamente simples selecionar mutantes para a perda de função em células derivadas de machos. Outra vantagem deste ensaio que o faz ser amplamente usado é a possibilidade de se conseguir comparar uma mutação no mesmo gene entre linhagens celulares, animais experimentais e células humanas (45). Neste teste é possível detetar substituições de pares de bases, pequenas deleções e inserções (44).

- f) *Ensaio γ -H2AX*. Trata-se de um ensaio que deteta indiretamente quebras de cadeia dupla de DNA (“double strand breaks”, DSB). As DSB são consideradas as lesões mais graves que podem ocorrer no DNA. Em resposta a este tipo de dano vai haver a formação de γ -H2AX, devido à fosforilação de uma histona nucleossomal central, a H2AX. Nos locais onde ocorrem estas quebras uma grande quantidade de cópias de γ -H2AX são formadas, sendo possível através de métodos imunológicos, a identificação desses locais (31). Para a deteção de γ -H2AX são usadas técnicas imunohistoquímicas com anticorpos monoclonais e/ou policlonais específicos do péptido C-terminal fosforilado da H2AX. As células, após serem expostas à substância em estudo, vão ser fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpos primários monoclonais ou policlonais anti- γ -H2AX e com anticorpo secundário fluorescente, sendo posteriormente detetadas e quantificadas (46).

Mecanismos de genotoxicidade

É crucial que se perceba os mecanismos de genotoxicidade associados a nanopartículas de forma a obter-se uma avaliação dos riscos válida e robusta. Estes mecanismos ainda não estão bem descritos e muitas vezes não é claro se os efeitos genotóxicos são específicos das nanopartículas. A genotoxicidade pode estar associada a uma interação direta das NP com o material genético ou por dano indireto induzido pela exposição às mesmas (31). Apesar do aumento no número de estudos realizados no sentido de investigar os fenómenos de nanogenotoxicidade, estes ainda não se encontram totalmente descritos e, por vezes, demonstram resultados contraditórios. Algumas publicações que descrevem estudos genotóxicos de diversas NP foram selecionados, tanto *in vitro* (Tabela 1) como *in vivo* (Tabela 2),

Tabela 1. Exemplos de estudos de nanogenotoxicidade *in vitro*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|---|---|---|---|-------------------|
| NP de Au de 5, 20 e 50 nm | - Ensaio do cometa com células HepG2 - CAs com células CHL | - Ensaio do cometa: Exposição de 4h ou 14h a concentrações de 1,65, 5 e 12,5 µg. ml ⁻¹ - CAs: Exposição de 4h ou 24h | - Não foi observado um aumento significativo no tamanho da cauda e na percentagem de DNA na cauda após 4h. Foi observado dano no DNA dependente do tamanho das NP após 24h, em que só as NP com 5 nm induziram um aumento significativo, dependente da concentração. - Não foi observado aumento na incidência de CAs. | (47) |
| NP de Ag revestidas com PVP e com 5,4 ± 1,2 nm de tamanho | - CBMN - Células linfoblásticas humanas TK6 | - Exposição de 28h a 0, 1, 1,25 e 1,5 µg/ml de NP de Ag | - Houve um aumento dependente da concentração na indução de MN e dos radicais hidroxilo. - Tratamento com NP de Ag apenas levou ao aumento de ROS após 24h de exposição. | (48) |

Tabela 1. Continuação dos exemplos de estudos de nanogenotoxicidade *in vitro*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|---|--|---|--|------------|
| NP de Ni com < 100 nm e NP de NiO com < 50 nm de diâmetro | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa alcalino - Células HBEC | <ul style="list-style-type: none"> - Células expostas durante 3h a um meio produzido por exposição de THP-1 a 50 µg/ml de NPs de Ni e NiO durante 3h e 18h. | <ul style="list-style-type: none"> - Liberação de citocinas (TNFα e IL-1b) pode explicar os danos no DNA, pois influenciam a produção intracelular de NO. - VEGF também leva à produção intracelular de ROS. - NP de Ni e NiO parecem causar genotoxicidade primária e secundária (devido à inflamação) | (49) |
| NP de Ni com < 100 nm de diâmetro e NPs de NiO com < 50 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN - CAs - Ensaio do cometa - Células BEAS-2B | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa e CBMN: Exposição de 48h a concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL - CAs: Exposição de 48h a uma concentração final de 5 µg /mL. | <ul style="list-style-type: none"> - Tanto as NP de Ni como de NiO provocaram danos nos cromossomas e evidenciaram um mecanismo onde não é necessário o <i>uptake</i> celular, mas depende da modulação intracelular de cálcio e ferro. - NP de NiO causaram mais quebras na cadeia de DNA e produção intracelular de ROS. - Sugere a produção de radicais hidroxilo e peroxinitrite por parte das NP de NiO e produção de H₂O₂ pelas NP de Ni. | (50) |
| NP de TiO ₂ com tamanhos de partícula entre 15-60 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN - Células humanas linfoblastóides TK6 | <ul style="list-style-type: none"> - Exposição a 3, 15 e 75 µg/cm² de NP de TiO₂ por 4h ou 24h | <ul style="list-style-type: none"> - Não houve um aumento significativo de células binucleadas micronucleadas em nenhuma dose usada nem nas diferentes durações do ensaio. | (51) |

Tabela 1. Continuação dos exemplos de estudos de nanogenotoxicidade *in vitro*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|--|--|---|---|------------|
| <p>MWCNT-Straight de 69,4 ± 1,4 nm</p> <p>MWCNT-Tangled de 15,3 ± 1,5 nm</p> | <p>- Ensaio do cometa</p> <p>- CBMN</p> | <p>- Ensaio do cometa: 24h de exposição a 5, 10, 50 e 100 µg/cm² de MWCNT-S e a 5, 10, 50, 100 e 200 µg/cm² de MWCNT-T</p> <p>-CBMN: Exposição de 48h a 2,5, 5, 10 e 20 µg/cm² de MWCNT-S e 5, 10, 50 e 100 µg/cm² de MWCNT-T</p> | <p>- MWCNT-S induziram um aumento nas quebras na cadeia de DNA, mas não foi detetada um efeito dose dependente. Os MWCNT-T induziram dano, mas só na dose mais alta.</p> <p>- Não houve indução de MN em nenhum dos materiais.</p> <p>- Os MWCNT-S conseguiram induzir dano primário no DNA que, ou não deu origem a quebras cromossômicas ou foi reparado eficientemente, e assim não afetou a frequência de MN.</p> <p>- Os MWCNT-S são mais nocivos que MWCNT-T.</p> | (52) |
| <p>NP de CeO₂ com 7 nm de diâmetro médio</p> | <p>- CBMN</p> <p>-Fibroblastos primários dérmicos de humanos</p> | <p>- Doses de 6x10⁵, 6x10⁴ e 6x10³ g/L (entre 0,22 - 22 mM) durante 48h</p> | <p>- Aumento da frequência de MN comparável ou maior do que das células tratadas com o agente clastogénico (mitomicina C) ou com o aneugéneo (colchicina).</p> <p>- MN formados eram maioritariamente centrómero-negativos, ou seja, evidenciavam um efeito clastogénico das nanopartículas.</p> | (53) |

Tabela 1. Continuação dos exemplos de estudos de nanogenotoxicidade *in vitro*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|--|---|---|--|------------|
| Cr ₂ O ₃ com 30 nm | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa - CBMN - Células de carcinoma de pulmão humanas A549 | <ul style="list-style-type: none"> - Exposição de 6h a concentrações entre 50 - 1000 µg/mL | <ul style="list-style-type: none"> - Indução significativa de dano no DNA. - Aumento nos níveis de ROS, de forma dose-dependente, com capacidade de indução de deleções, mutações e dano oxidativo no DNA. - As NP de Cr₂O₃ podem levar a uma produção do radical superóxido mediada pela proteína p53. | (54) |
| NP de CeO ₂ com menos de 25 nm de tamanho | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa - CBMN - Ensaio γ-H2AX | <ul style="list-style-type: none"> - Concentrações de 6, 12 e 18 µg/mL - CBMN: exposição de 24h - Ensaio do cometa e γ-H2AX: Exposição de 3h | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN: A frequência de MN ultrapassou a do controlo positivo nas concentrações de 12 e 18 µg/mL, aumentando com a dose. - Ensaio do cometa: A dose mais alta foi a que se aproximou mais do valor de índice de dano genético do controlo positivo. - γ-H2AX: As três doses aumentaram significativamente as quebras de dupla cadeia nos linfócitos. A dose mais alta induziu um dano maior que o controlo positivo. | (55) |

Tabela 1. Continuação dos exemplos de estudos de nanogenotoxicidade *in vitro*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|---|---|--|---|-------------------|
| NP amorfas de Si com 12 nm, 5-15 nm e 10-20 nm | - CBMN -Células pulmonares epiteliais (FE1) de Ratos Muta™ | - 12h de exposição a concentrações de 12,5 µg/mL das diferentes nanopartículas de sílica | - Aumento estatisticamente significativo de MN nas células tratadas com NP de Si de 5-15, 12 e 10-20 nm, da maior frequência para a menor. - A formação de MN aumenta com a área de superfície. | (56) |
| NP de PVP-Ag (Argovit®) com 35 nm e NP de PVP-Ag de 50 nm (nanoComposix) | - CBMN | - Concentrações de 0,012, 0,12, 1,2, e 12 µg/mL | - As NP de Ag de 50 nm produziram os danos citotóxicos e genotóxicos maiores de entre todos os compostos testados, ao contrário das NP de 30 nm que não provocaram efeitos nem citotóxicos nem genotóxicos. | (57) |
| Pontos quânticos de Ag ₂ S revestidos com DMSA com tamanho hidrodinâmico de 2,9 nm | - Ensaio do cometa - Fibroblastos pulmonares de hamster chineses | -Células expostas a diferentes concentrações da NP (5-2000 µg/mL) durante 24h. | - Não foi observado dano no DNA com significado estatístico, visto que não houve alteração na intensidade da cauda. - Esta NP teve uma alta biocompatibilidade e baixa toxicidade. | (58) |

NP: Nanopartículas; CA: Aberrações cromossômicas; CBMN: Ensaio do micronúcleo em células com a citocinese bloqueada; ROS: Espécies reativas de oxigênio; MWCNT-S: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas direitas; MWCNT-T: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas entrelaçadas; MN: Micronúcleos; PVP: Polivinilpirrolidona.

Tabela 2. Estudos de genotoxicidade *in vivo*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|---|---|--|---|------------|
| TiO ₂ - NP de anatase com 1nm | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa alcalino - Ensaio do cometa com hOGG1 - Ensaio do cometa com EndoIII - Ratos macho B6C3F1 | <ul style="list-style-type: none"> - 0 e 15 mg/Kg/dia durante 3 dias por injeção intraperitoneal. - Retiradas amostras de pulmão e fígado 4h após a última administração | <ul style="list-style-type: none"> - NP comprometeram o DNA e induziram <i>stress</i> oxidativo, respostas inflamatórias e apoptose do tecido pulmonar. - Danos no DNA resultaram principalmente de nucleótidos oxidados devido ao <i>stress</i> oxidativo induzido pelas NP de TiO₂ | (59) |
| Cr ₃ O ₃ com 23,47 nm de tamanho medio | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN -CAs -Ratos Wistar machos | <ul style="list-style-type: none"> - 50 µg/100g de peso e 200µg/100g de peso com administração oral de toma única, uma vez por dia durante 7 dia e durante 14 dias. | <ul style="list-style-type: none"> - Uma dose única de NP de Cr₂O₃ potencialmente causa danos genéticos e induz aberrações cromossômicas, tais como formação de anéis, fragmentos acêntricos e atenuações centroméricas. | (60) |
| TiO ₂ com tamanho medio de 21 nm, 20% de rutilio e 80% anatase | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN - Ensaio do cometa alcalino - Ratos macho <i>gpt</i> Delta C57BL/6J | <ul style="list-style-type: none"> Doses de 2, 10 ou 50 mg/kg de peso corporal por semana, durante 4 semanas | <ul style="list-style-type: none"> - Não houve efeitos mutagénicos ou clastogénicos/ aneugénicos nas células tronco hematopoiéticas na medula nem efeitos genotóxicos nos hepatócitos. - A inexistência de NP no núcleo pode explicar a ausência de efeitos genotóxicos. Parâmetros como IL-6 e TNF-α não estavam aumentados. | (61) |

Tabela 2. Continuação dos estudos de genotoxicidade *in vivo*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|--|---|--|---|------------|
| Pontos quânticos com core-shell CdSe/ZnS | <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa - CBMN - Ratos machos adultos Sprague Dawley – | <ul style="list-style-type: none"> - Injeção Intra peritoneal única com concentrações de 0,005 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,5 µg/kg e 5 µg/kg de pontos quânticos -Retiradas amostras do fígado, rim, pulmões, cérebro e testículos. | <ul style="list-style-type: none"> -Ensaio do cometa: Resultados heterogêneos. A exposição induziu um aumento significativo do dano no DNA dose-dependente no cérebro e fígado e nos testículos só na dose de 5 µg/kg. Nos pulmões não houve nenhuma resposta significativa. Nos rins só nas três doses mais altas houve resposta, não dose-dependente. - CBMN: Resultados homogêneos, com um aumento dose-dependente da frequência de MN e atividade clastogénica. | (62) |
| NP de Ag com tamanho de 98,3 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN - Ensaio do cometa - 32 ratos macho Wistar | <ul style="list-style-type: none"> - Três grupos receberam injeções intraperitoneais de uma solução de NP de Ag com 3 mg de NP por quilo de peso corporal diariamente, durante 1, 2 ou 3 semanas. | <ul style="list-style-type: none"> - Cauda maior nos grupos expostos durante 2 e 3 semanas, indicando dano no DNA dependente do tempo de exposição. -CBMN: Maior frequência de MN que os controles no grupo exposto durante 3 semanas. - Níveis de ROS significativamente mais elevados passadas 2 e 3 semanas. Níveis de antioxidantes e GSH diminuídos. <i>Stress oxidativo</i> como mecanismo provável. | (63) |

Tabela 2. Continuação dos estudos de genotoxicidade *in vivo*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|--|---|--|--|------------|
| NPs de Au de 5, 20 e 50 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN standard e de longa duração - Ratos adultos Kunming | <ul style="list-style-type: none"> - Teste standard: Injeção i.v. diária de 0,02, 0,1 e 0,5 mg.kg⁻¹ durante 4 dias - Teste longa duração: Injeção i.v. de 0,17 e 0,5 mg.kg⁻¹ das NPs diária durante 14 dias. | <ul style="list-style-type: none"> - Standard: Não houve aumento na frequência de MN, independentemente do tamanho da NP. - Longa duração: Só os NP de Au de 5nm levaram a um aumento significativo na frequência de MN na dose mais elevada, sugerindo a existência de dano após uma longa exposição. | (47) |
| NP de sílica com tamanhos entre 20-30 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN em ratos machos Sprague Dawley de 8 semanas | <ul style="list-style-type: none"> Doses de 500 ppm e 1000 ppm de NP de sílica na água durante 28 dias. | <ul style="list-style-type: none"> - Frequência de MN significativamente aumentada no grupo exposto a 1000 ppm de NP de Si. - Níveis de MDA elevados e níveis de GSH e atividade da catalase significativamente reduzidas no grupo exposto à dose de 1000 ppm. | (64) |
| SWCNT com diâmetro de 1-1,2 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN em ratos ICR machos com 8 semanas | <ul style="list-style-type: none"> Doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg por via intra peritoneal | <ul style="list-style-type: none"> - Não foram observados efeitos genotóxicos com significado estatístico. - SWCNT foram encontrados na cavidade abdominal dos ratos. | (65) |

Tabela 2. Continuação dos estudos de genotoxicidade *in vivo*

| Tipo de NP | Ensaio e características | Dose/ Duração da Exposição | Resultados | Referência |
|---|--|---|--|------------|
| NP de TiO ₂ com tamanhos de partícula entre 15-60 nm | <ul style="list-style-type: none"> - CBMN em eritrócitos policromáticos da medula óssea de rato - Ensaio do cometa em células sanguíneas periféricas | <ul style="list-style-type: none"> - Dose única de NP de TiO₂ de 0,59 mg/kg (1% da DL₅₀ por kg de peso corporal), por injeção intravenosa. Sacrifício passados 1 dia ou 1, 2 e 4 semanas. | <ul style="list-style-type: none"> - O dano no DNA aumentou após um dia. - CBMN: Não foram observados nem efeitos citotóxicos nem mutagênicos. | (51) |

NP: Nanopartículas; CBMN: Ensaio do micronúcleo em células com a citocinese bloqueada; CA: Aberrações cromossômicas; MN: Micronúcleos ROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutaciona; IV: intravenoso; MDA: Malondialdeído; SWCNT: Nanotubos de carbono de parede única; DL50: Dose letal média

No estudo realizado por Li *et al.* (48) foi descrito um conjunto de mecanismos envolvidos na genotoxicidade de nanopartículas de prata. Foi observada uma desregulação nos genes envolvidos no *stress* oxidativo, nomeadamente GPX7, TPO, HMOX1, e na ligação de íons metálicos como MT1B, MT1H, MT1X e MT2A. Estes últimos pertencem às metalotioneínas, biomarcadores para a toxicidade induzida por metais. Foi também posta a questão dos efeitos genotóxicos observados serem derivados da presença do íon Ag⁺ ou da própria nanopartícula. Neste estudo foi analisado o efeito de um quelante do íon prata, a N-acetilcisteína, e uma substância antioxidante análoga da vitamina E, o Trolox. Observou-se que houve um efeito reduzido da N-acetilcisteína na citotoxicidade das nanopartículas e um efeito protetor, sem significado estatístico, na formação de MN e ROS. Já o antioxidante demonstrou uma redução na indução de ROS e MN, o que sugere que a indução de genotoxicidade por parte das nanopartículas de Ag é por via do *stress* oxidativo e ocorre devido à nanopartícula em si e não à libertação do íon Ag⁺ (48).

Noutro estudo, de Benameur *et al.*, centrado em nanopartículas de CeO₂, foi observado que a ocorrência de MN no ensaio CBMN era maioritariamente de MN centrómero-negativos, isto é, micronúcleos que correspondem a fragmentos cromossômicos acêntricos, formados por DSB. Ou seja, foi mais evidente o efeito clastogénico das nanopartículas, o qual origina aberrações estruturais cromossômicas. O mesmo mecanismo clastogénico destas nanopartículas foi inibido a valores basais na presença de catalase, uma enzima intracelular

capaz de decompor o peróxido de hidrogénio, o que sugere que esta espécie reativa possa ter um papel importante. Os efeitos genotóxicos observados foram significativamente menores na escala micro relativamente ao mesmo material na nanoescala. Também foi observado um aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), o que indica um aumento da peroxidação lipídica. De referir que as doses menores de nanopartículas de CeO₂ usadas neste estudo (mais próximas da concentração num contexto de exposição crónica) apesar de terem aumentado a frequência de MN, não induziram significativamente a citotoxicidade, isto é, a perda de viabilidade e necrose. Os autores propõem então que o mecanismo provável para o efeito clastogénico deste tipo de nanopartículas tenha por base a difusão de O₂⁻ / H₂O₂ (formado na mitocôndria e/ou quando a NADPH oxidase membranar é estimulada) para o núcleo, onde pode sofrer uma conversão catalisada por metais em radical hidroxilo HO[•], reagindo com o DNA. As ROS e os subprodutos da peroxidação lipídica, como o MDA, desempenham provavelmente um papel importante nos efeitos genotóxicos em termos de danos clastogénicos (53). No entanto, existem estudos com resultados divergentes. Nos ensaios realizados por Aye *et al.* (62), existiu um aumento evidente na frequência de MN em todos os tecidos analisados (sendo a percentagem obtida na concentração mais elevada superior à obtida pelo controlo positivo). No entanto, os resultados do ensaio do cometa não foram tão homogéneos. A análise aos parâmetros relativos à ocorrência de *stress* oxidativo e inflamação também demonstrou que as alterações não foram significativas. Isso pode ter ocorrido devido ao facto de as avaliações a estes parâmetros terem sido realizadas após 24 h de injeção intra-peritoneal e os pontos quânticos terem induzido *stress* oxidativo poucas horas após a injeção. Os autores observaram a existência de um impacto genotóxico dos pontos quânticos nas células germinativas, na dose mais alta estudada, sem apresentar, no entanto, nenhuma relação dose-resposta (62).

Noutro estudo com resultados heterogéneos, Kazimirova *et al.* (51) observaram que os efeitos genotóxicos derivados da exposição a NP de TiO₂ podem depender do meio em que as nanopartículas são preparadas. Ensaio *ex vivo* realizados em 13 voluntários demonstraram uma grande variabilidade na lesão de DNA induzida, o que pode ser atribuído à suscetibilidade individual. Nos dados *in vivo* retirados deste estudo também se pode observar que os resultados dependem da altura da recolha das células, visto que um valor maior de dano no DNA foi encontrado um dia após a injeção das nanopartículas do que após 2 e 4 semanas. No panorama geral, obtêm-se mais resultados positivos nos ensaios *in vitro* do que nos *in vivo*. O facto de, neste estudo, o ensaio cometa e o ensaio dos micronúcleos darem aparentemente resultados contrários pode ser devido aos mecanismos subjacentes aos efeitos genotóxicos, uma vez que cada ensaio avalia a genotoxicidade por mecanismos diferentes (51).

Outro dos mecanismos descritos na literatura são os fenómenos de inflamação. Nos ensaios efetuados por Åkerlund *et al.*(49) foi observado o aumento de várias citocinas após exposição a macrófagos previamente expostos às NP. Os níveis de IFN- α e IL-17A estavam aumentados após 3h de exposição. Estas citocinas são marcadores para a hipersensibilidade tardia, habitualmente produzidas por células NK e células T Helper 17. Existiu também um aumento do fator inibitório de migração dos macrófagos (MIF) e da citocina VEGF. A primeira é considerada um fator pró-tumorigénico, enquanto que a segunda tem um papel na angiogénese associada a tumores. Foi demonstrado que a inflamação resultou em genotoxicidade, pois o meio formado por macrófagos expostos às NP causou lesão do DNA. Pensa-se que esses danos ocorreram devido à acumulação de óxido nítrico sintase dentro das células epiteliais devido às citocinas pró-inflamatórias, resultando na produção intracelular de NO (49).

Noutro estudo, realizado por Li *et al.*(59), revelou que as vias significativamente mais reguladas, devido ao tratamento com NP de TiO₂, estão associadas ao *stress* oxidativo e ao NRF2. Observou-se que o gene haptoglobina foi um dos que teve a sua regulação mais aumentada, uma proteína associada à fase aguda de infeções e inflamação. Concluiu-se então que as NP aqui utilizadas interromperam a homeostase metabólica no tecido hepático, enquanto induziram *stress* oxidativo, respostas inflamatórias e apoptose no tecido pulmonar. O dano ocorrido no DNA revelou-se maioritariamente na formação de nucleótidos oxidados. Já no tecido hepático tanto a interrupção do metabolismo lipídico e da glicose como a desregulação do metabolismo xenobiótico tiveram como impulsionadores fenómenos de *stress* oxidativo (59).

O potencial genotóxico de uma nanopartícula pode ser influenciado por vários fatores, entre os quais o revestimento. Nos ensaios realizados por Galeone *et al.* (66), o mesmo tipo de NP (neste caso pontos quânticos de CdSe-ZnS) com diferentes tipos de revestimento foram analisados: revestimento com ácido mercaptoundecanoico (QD-MUA), revestimento de polímero e polietilenoglicol (QD-PC-PEG) e revestimento de polímero com octadeceno de anidrido poli-maleico (QD-PC). O tempo de vida das drosófilas foi claramente diminuído pela exposição aos pontos quânticos, tendo existido diferenças significativas nos diferentes revestimentos, com os QD-MUA considerados os mais prejudiciais. Também se observou um aumento dos níveis de ROS, sendo estes revestimento-dependentes. Os autores concluem assim que a redução do tempo de vida se deve à produção intracelular excessiva de ROS, provavelmente consequência da libertação intracelular de iões Cd²⁺. Concluiu-se que a toxicidade dos pontos quânticos *in vivo* se deve maioritariamente à sua degradação *in situ*, com a libertação intracelular de iões metálicos, que leva a um aumento do *stress* oxidativo e à indução de resposta da homeostase celular. Apesar do mecanismo não estar totalmente

esclarecido, pensa-se que os íons de cádmio intracelulares ao excederem a capacidade das moléculas antioxidantes vão interagir com os sítios de ligação catiónicos das enzimas e com tiolatos de cisteína reativos das proteínas. Após uma exposição crónica vai ocorrer um aumento do estado de oxidação celular e a superprodução de ROS, podendo esta ser ainda amplificada devido à ocorrência de reações de *Fenton* (66).

Tem sido também descrito na literatura a capacidade de certas NP de perturbar o funcionamento normal do ciclo celular. Xu *et al.* (67) investigaram os efeitos genotóxicos de pontos quânticos de grafeno. Observou-se que a exposição a pontos quânticos de grafeno modificados com aminas (AG-QDs, 100 µg/mL) alterou a expressão de 2898 genes em células NR8383. Neste estudo, 1335 desses genes estavam regulados positivamente enquanto 1563 estavam regulados negativamente. Esta alteração na expressão de genes vai alterar a progressão do ciclo celular. Ocorreu também a diminuição de Rb11 fosforilado e consequentemente a regulação negativa de E2f1, 2 e 3, o que leva a que a síntese de DNA e a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S seja suprimido. A diminuição da expressão dos genes Cdc45 também bloqueou a iniciação da replicação do DNA. Outro gene regulado negativamente nas células NR8383, o Cdc20, induz a interrupção da fase M do ciclo celular, devido à perturbação da separação das cromátides-irmãs (67).

Os efeitos das NP nas substâncias antioxidantes presentes no organismo também podem levar a um aumento no dano do DNA. Num estudo de Azouz *et al.* (64), para além do aumento da frequência de MN observada na exposição a 1000 ppm de NP de sílica foi também observado um aumento significativo nos níveis de MDA, um marcador para o *stress* oxidativo. No entanto, tanto a atividade de catalase e os níveis de GSH estavam significativamente reduzidos, tanto no fígado como nos rins dos animais expostos à dose mais elevada. Estas últimas substâncias têm um papel crucial na inativação de radicais e ROS e, devido à diminuição da sua quantidade, vai existir um acumular destes radicais e consequentemente um aumento do dano no DNA e na célula. Através da imunocoloração da proteína caspase-3 confirmou-se que as NP de sílica induziu danos nos tecidos por apoptose e que o *stress* oxidativo foi relatado como uma via para o apoptose e inflamação induzidas por estas NP (64). A Figura 2 procura esquematizar os diferentes mecanismos de genotoxicidade descritos na literatura para as nanopartículas.

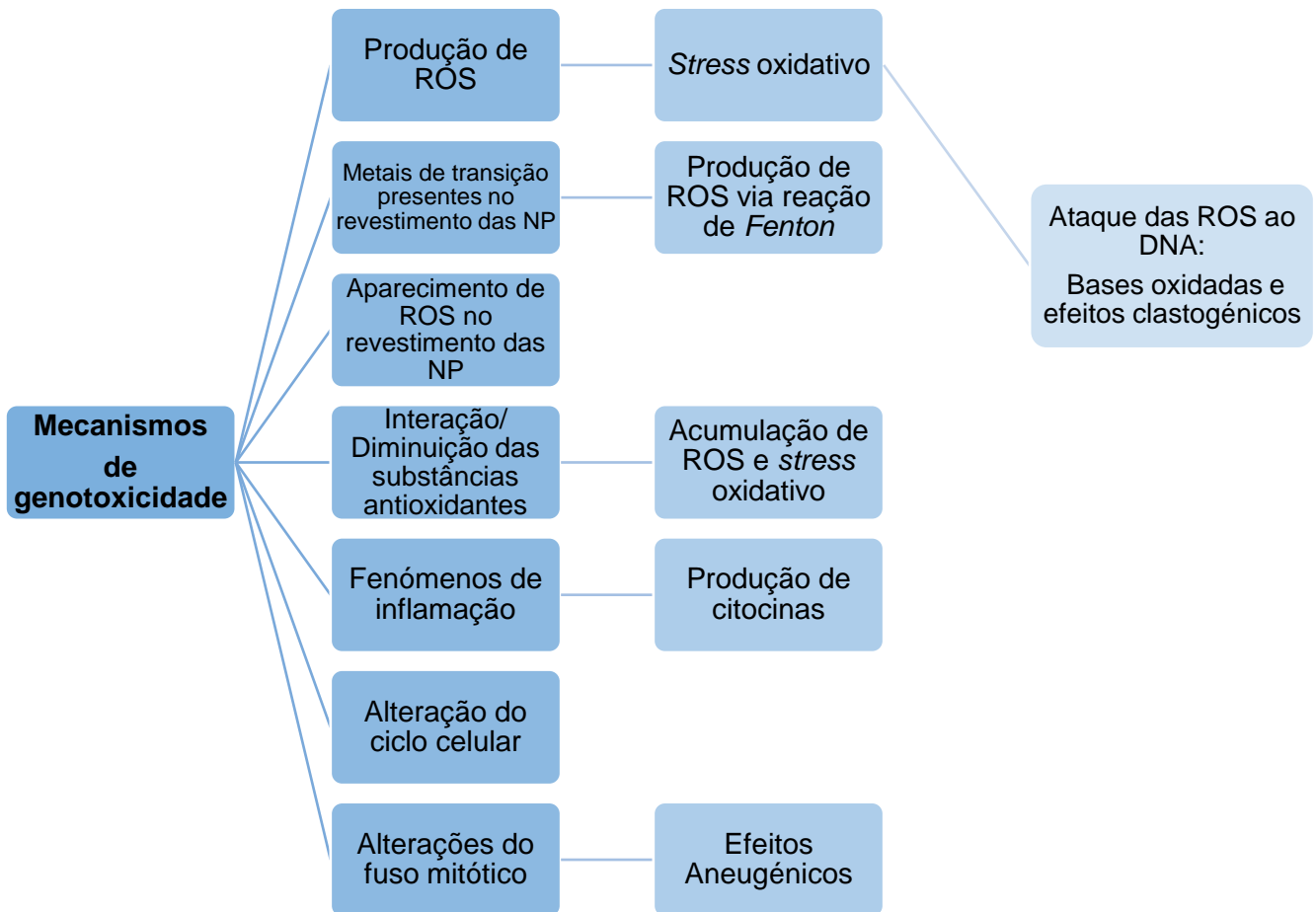


Figura 2. Esquemas dos possíveis mecanismos de genotoxicidade induzida por nanopartículas. A formação de ROS está associada à formação de bases oxidadas e a clastogenicidade. As alterações ao nível do fuso mitótico poderão dar origem a alterações numéricas dos cromossomas (efeito aneugénico).

Conclusão

O impacto da exposição crescente dos humanos a nanopartículas e a informação inadequada do seu potencial genotóxico é uma preocupação da comunidade científica. Apesar da existência de um aumento de estudos publicados sobre este assunto, as informações recolhidas são muitas vezes difíceis de comparar. Isso deve-se à falta de alguns dados importantes, caracterizações incompletas das nanopartículas e/ou à falta de qualidade e adequação das metodologias utilizadas. Os dados recolhidos na literatura apontam, no panorama geral, para a existência de genotoxicidade por parte de alguns tipos de nanopartículas. Os mecanismos descritos com mais regularidade são o *stress oxidativo* e fenómenos de inflamação. No entanto, alterações induzidas no ciclo celular e efeitos nas

substâncias antioxidantes produzidas pelo organismo podem ter influência na genotoxicidade destes materiais, para além dos mecanismos de genotoxicidade direta.

É necessário um aumento dos estudos *in vivo* para melhor caracterização dos mecanismos associado à genotoxicidade e a criação de uma bateria de ensaios citotóxicos e genotóxicos específicos para os nanomateriais, de forma a facilitar a avaliação de riscos num contexto regulatório. A área da nanogenotoxicidade está cheia de desafios devido ao vasto leque de mecanismos possíveis, à diversidade de nanopartículas existentes e à variedade de vias que podem levar a um efeito genotóxico. Uma correta caracterização destes mecanismos é assim essencial para o ainda maior desenvolvimento da nanotecnologia e para a utilização no seu potencial máximo.

Referências Bibliográficas

1. Benefits and Applications | Nano [Internet]. [cited 2020 Oct 2]. Available from: <https://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>
2. Singh S. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2019;29(4):300–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2018.1553221>
3. Hobson DW, Roberts SM, Shvedova AA, Warheit DB, Hinkley GK, Guy RC. Applied Nanotoxicology. *Int J Toxicol*. 2016;35(1):5–16.
4. Nanotechnology Market Research Report: Market size, Industry outlook, Market Forecast, Demand Analysis, Market Share, Market Report 2020-2025 [Internet]. [cited 2020 Oct 2]. Available from: <https://www.industryarc.com/Report/15022/nanotechnology-market.html>
5. Nanotechnology 2020 Market Analysis | SciTechnol [Internet]. [cited 2020 Oct 2]. Available from: https://www.scitechnol.com/peer-review/nanotechnology-2020-market-analysis-YrpE.php?article_id=9973
6. Commission T, European T, Joint C. On the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) - Commission Recommendation 2011/696/EU, OJ L 275, 20.10.2011. 2011;(June 2010):2010–2. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/
7. ISO. Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series [Internet]. [cited 2020 Nov 21]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en>

8. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10(1).
9. Senchukova M. A Brief Review about the Role of Nanomaterials, Mineral-Organic Nanoparticles, and Extra-Bone Calcification in Promoting Carcinogenesis and Tumor Progression. *Biomedicines.* 2019;7(3):65.
10. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 2007;150(5):552–8.
11. Astefanei A, Núñez O, Galceran MT. Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;882:1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
12. Dellinger A, Zhou Z, Connor J, Madhankumar A, Pamujula S, Sayes CM, et al. Application of fullerenes in nanomedicine: An update. *Nanomedicine.* 2013;8(7):1191–208.
13. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* [Internet]. 2019;12(7):908–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
14. Negri V, Pacheco-Torres J, Calle D, López-Larrubia P. Carbon Nanotubes in Biomedicine [Internet]. Vol. 378, Topics in Current Chemistry. Springer International Publishing; 2020. 1–41 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8>
15. Singh D, Singh S, Sahu J, Srivastava S, Singh MR. Ceramic nanoparticles: Recompense, cellular uptake and toxicity concerns. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2016;44(1):401–9.
16. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2012;8(2):147–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
17. Singh D, Dubey P, Pradhan M, Singh MR. Ceramic nanocarriers: Versatile nanosystem for protein and peptide delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(2):241–59.
18. Li N, Liu D, Cui H. Metal-nanoparticle-involved chemiluminescence and its applications in bioassays. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(23):5561–71.
19. Singh P, Pandit S, Mokkaapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).

20. Lin Z, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2015;7(2):189–217.
21. Panahi Y, Farshbaf M, Mohammadhosseini M, Mirahadi M, Khalilov R, Saghfi S, et al. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. 2017;45(4):788–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>
22. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: From concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2009;26(6):523–80.
23. El-Say KM, El-Sawy HS. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;528(1–2):675–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>
24. Matea CT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:5421–31.
25. Pleskova S, Mikheeva E, Gornostaeva E. Using of quantum dots in biology and medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1048:323–34.
26. Jha S, Mathur P, Ramteke S, Jain NK. Pharmaceutical potential of quantum dots. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. 2018;46(sup1):57–65. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1411932>
27. Cartaxo A. Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2018;1–8. Available from: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/844820067124759/ABSTRACTAnaCartaxo.pdf>
28. Gupta PK. *Fundamentals of Toxicology Fundamentals of Toxicology Essential Concepts*.
29. European Medicines Agency. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. *ICH Guidel*. 2008;2(March):1–28.
30. Dusinska M, Boland S, Saunders M, Juillerat-Jeanneret L, Tran L, Pojana G, et al. Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: Lessons from NanoTEST. *Nanotoxicology*. 2015;9(S1):118–32.
31. Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles.

- Nanotoxicology. 2014;8(3):233–78.
32. OECD. Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials. OECD Environ Heal Saf Publ Ser Saf Manuf Nanomater ENV/JM/MONO(2012)/8. 2012;(33).
 33. Chen T, Yan J, Li Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. J Food Drug Anal [Internet]. 2014;22(1):95–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.008>
 34. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. Expert Opin Drug Metab Toxicol [Internet]. 2017;13(10):1089–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
 35. Golbamaki N, Rasulev B, Cassano A, Marchese Robinson RL, Benfenati E, Leszczynski J, et al. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of recent data and discussion of possible mechanisms. Nanoscale. 2015;7(6):2154–98.
 36. Mahaye N, Thwala M, Cowan DA, Musee N. Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. Mutat Res - Rev Mutat Res [Internet]. 2017;773:134–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>
 37. Barbezán AB, Martins R, Bueno JB, Villavicencio ALCH. Ames Test to Detect Mutagenicity of 2-Alkylcyclobutanones: A Review. J Food Sci. 2017;82(7):1518–22.
 38. Decordier I, Kirsch-Volders M. The in vitro micronucleus test: From past to future. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen. 2006;607(1):2–4.
 39. OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: 487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Organ Econ Co-operation Dev Publ [Internet]. 2016;(July):29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264861-en>
 40. Doak SH, Manshian B, Jenkins GJS, Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen [Internet]. 2012;745(1–2):104–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.013>
 41. OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Organ Econ Co-operation Dev Publ. 2016;(July):21.
 42. OECD. Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2016;(July).
 43. OECD. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

- 2016;(July).
44. OECD. Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes. 2015;(July).
 45. Johnson GE. Mammalian Cell HPRT Gene Mutation Assay: Test Methods. Methods [Internet]. 2012;817:35–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147567>
 46. Organisation for Economic Co-operation and Development. Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment applied in the OECD Testing Programme for the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2018;(36):93.
 47. Xia Q, Li H, Liu Y, Zhang S, Feng Q, Xiao K. The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2017;105(3):710–9.
 48. Li Y, Qin T, Ingle T, Yan J, He W, Yin JJ, et al. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):509–19.
 49. Åkerlund E, Islam MS, McCarrick S, Alfaro-Moreno E, Karlsson HL. Inflammation and (secondary) genotoxicity of Ni and NiO nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2019;13(8):1060–72.
 50. Di Bucchianico S, Gliga AR, Åkerlund E, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, et al. Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):1–14.
 51. Kazimirova A, Baranokova M, Staruchova M, Drlickova M, Volkovova K, Dusinska M. Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays in vitro, ex vivo and in vivo. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2019;843(May):57–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.001>
 52. Catalán J, Siivola KM, Nymark P, Lindberg H, Suhonen S, Järventaus H, et al. In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*. 2016;10(6):794–806.
 53. Benameur L, Auffan M, Cassien M, Liu W, Culcasi M, Rahmouni H, et al. DNA damage and oxidative stress induced by CeO₂ nanoparticles in human dermal fibroblasts: Evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity. *Nanotoxicology*. 2015;9(6):696–705.
 54. Senapati VA, Jain AK, Gupta GS, Pandey AK, Dhawan A. Chromium oxide nanoparticle-induced genotoxicity and p53-dependent apoptosis in human lung alveolar

- cells. *J Appl Toxicol*. 2015;35(10):1179–88.
55. Könen-Adıgüzel S, Ergene S. In vitro evaluation of the genotoxicity of CeO₂ nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes using cytokinesis-block micronucleus test, comet assay, and gamma H2AX. *Toxicol Ind Health*. 2018;34(5):293–300.
 56. Decan N, Wu D, Williams A, Bernatchez S, Johnston M, Hill M, et al. Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2016;796:8–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.011>
 57. Ruiz-Ruiz B, Arellano-García ME, Radilla-Chávez P, Salas-Vargas DS, Toledano-Magaña Y, Casillas-Figueroa F, et al. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*. 2020;5(21):12005–15.
 58. Özkan Vardar D, Aydin S, Hocaoglu İ, Yağci Acar H, Başaran N. An in vitro study on the cytotoxicity and genotoxicity of silver sulfide quantum dots coated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Turkish J Pharm Sci*. 2019;16(3):282–91.
 59. Li Y, Yan J, Ding W, Chen Y, Pack LM, Chen T. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017;32(1):33–46.
 60. Fatima R, Ahmad R. Hepatotoxicity and chromosomal abnormalities evaluation due to single and repeated oral exposures of chromium oxide nanoparticles in Wistar rats. *Toxicol Ind Health*. 2019;35(8):548–57.
 61. Suzuki T, Miura N, Hojo R, Yanagiba Y, Suda M, Hasegawa T, et al. Genotoxicity assessment of intravenously injected titanium dioxide nanoparticles in gpt delta transgenic mice. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2016;802:30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.007>
 62. Aye M, Di Giorgio C, Mekaouche M, Steinberg JG, Brerro-Saby C, Barthélémy P, et al. Genotoxicity of intraperitoneal injection of lipoamphiphile CdSe/ZnS quantum dots in rats. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2013;758(1–2):48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.004>
 63. Liu Y, Sun L, Yang G, Yang Z. Nephrotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in juvenile rats and possible mechanisms of action. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2020;71(2):121–9.

64. Azouz RA, Korany RMS. Toxic Impacts of Amorphous Silica Nanoparticles on Liver and Kidney of Male Adult Rats: an In Vivo Study. *Biol Trace Elem Res*. 2020;
65. Kim JS, Song KS, Yu IJ. Evaluation of in vitro and in vivo genotoxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicol Ind Health*. 2015;31(8):747–57.
66. Galeone A, Vecchio G, Malvindi MA, Brunetti V, Cingolani R, Pompa PP. In vivo assessment of CdSe-ZnS quantum dots: Coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale*. 2012;4(20):6401–7.
67. Xu L, Zhao J, Wang Z. Genotoxic response and damage recovery of macrophages to graphene quantum dots. *Sci Total Environ*. 2019;664:536–45.