

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS E APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS EXPOSTOS A NANOFIBRAS DE CELULOSE E A NANOTUBOS DE CARBONO

*Michele Munk Pereira¹, Eliza Diniz de Souza², Carolina Capobianco Romano Quintão², Juliana Gern², Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, José Manoel Marconcini³, Luiz Sérgio de Almeida Camargo², Luiz Orlando Ladeira⁴, Humberto de Mello Brandão²

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG. ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ³Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. ⁴Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG.
*mimunkbio@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos de nanofibras de celulose (NFC) e nanotubos de carbono multicamadas carboxilados (MWCNT-COOH) no número de células e apoptose em embriões bovinos. Os embriões foram produzidos por fertilização *in vitro* após maturação de óocitos coletados em abatedouro local. No sétimo dia após fertilização, os blastocistos foram aleatoriamente divididos em três grupos: grupo controle (sem nanopartículas; n=19), NFC (0,2µg ml⁻¹; n=16) e MWCNT-COOH (0,2µg ml⁻¹; n=16). Os embriões foram cultivados na presença de nanopartículas por 72h em meio CR2aa com 10% de soro fetal bovino em 5% CO₂ a 38,5°C em ar atmosférico. Posteriormente, os blastocistos foram submetidos à técnica de TUNEL. Os dados foram analisados por ANOVA e teste SNK. O nível de significância adotado foi P= 0,05. O número total de células e o índice apoptótico não foi alterado entre os grupos (P>0,05). Em conclusão, a adição de NFC ou MWCNT-COOH, nas condições testadas, não afetou a cinética de desenvolvimento pré-implantacional e o índice de apoptose nos embriões bovinos.

Palavras-chave: Nanomateriais; Embriotoxicidade; Apoptose

IN VITRO ANALYSIS OF CELLULOSE NANOFIBERS AND MUTIWALLED CARBON NANOTUBES EFFECTS IN NUMBER OF CELLS AND APOPTOSIS IN EMBRYO

Abstract

The aim of present study was to investigate the cotton cellulose nanofibers (CNF) and multiwalled carbon nanotubes with carboxylate functionalization (MWCNT-COOH) effects on cell number and the incidence of apoptosis in bovine blastocysts. The embryos were produced after *in vitro* maturation and fertilization of oocytes obtained of ovaries collected from slaughtered cows. At day seven post-fertilization embryos at blastocyst stage were randomly distributed into three culture groups: control group (without nanomaterials; n=19), cotton CNF (0,2µg ml⁻¹; n=16) and MWCNT-COOH (0,2µg ml⁻¹; n=16). Embryos in both groups were cultured in CR2aa medium and NPs, supplemented with 10% of fetal calf serum and granulosa cell monolayer, for 72hr under 5% CO₂ at 38,5°C in air. The embryos at tenth day post fertilization were permeabilized for TUNEL assay. Total cell number and apoptotic cell index were analyzed by ANOVA and SNK test. Total cell number and apoptotic cell number was similar (P>0.05) between groups. In conclusion, under the conditions tested, both cotton CNF and MWCNT-COOH does not interfere on preimplantation development and the incidence of apoptosis in bovine blastocysts.

Keywords: Nanomaterials; Embryotoxicity; Apoptosis

Publicações relacionadas:

PEREIRA, M. M.; GERN, J.C.; BARBOSA, N. R.; SOUZA, E. D.; MATTOSO, L.H.C.; Camargo, L.S.A.; LADEIRA, L.O.; BRANDÃO, H.M. Expressão gênica de biomarcadores de estresse e multipotência em embriões mamíferos expostos à nanofibras de celulose e à nanotubos de carbono. In: VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2013, São Carlos. Anais do VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção e uso de nanomateriais (NMs) em diferentes segmentos tem causado

preocupações sobre o potencial impacto desses produtos na saúde pública (LING et al., 2012). Embriões bovinos são bons modelos de toxicidade para testes de agentes potencialmente teratogênicos, pois são sensíveis a toxicantes, bem como pelas suas similaridades morfológicas e bioquímicas a embriões humanos (LEIDENFROST et al., 2011). Dados toxicológicos existentes sobre a interação de nanotubos de carbono (NTCs) em embriões mamíferos ainda são incipientes (PEREIRA et al., 2010a) ou foram obtidos em períodos pós-implantação (ZALGIEVIČIENĖ et al., 2012). Com relação às nanofibras de celulose (NFCs) não são conhecidos seus efeitos em embriões mamíferos. Portanto, há uma necessidade de estudos que avaliem o potencial teratogênico de novos materiais para a obtenção de resultados mais conclusivos e seguros sobre a toxicidade de NTC e NFCs.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de NFC e NTC multicamadas carboxiladas (MWCNT-COOH) no número celular e apoptose *in situ* em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Oócitos imaturos foram obtidos de ovários coletados de animais abatidos e maturados e fertilizados *in vitro*. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo embrionário CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubadora com 5% CO₂, ar atmosférico e umidade saturada, por 7 dias. Posteriormente, os embriões foram divididos em 3 grupos: controle, expostos a 0,2 µg ml⁻¹ de NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225 µm) ou MWCNT-COOH (diâmetro: 10-50 nm; comprimento: 5-30 µm) por 72h. Os blastocistos expostos aos NMs foram fixados em formaldeído 4%. A fragmentação do DNA foi avaliada com o Kit comercial *Dead end fluorimetric terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end (TUNEL) System* (Promega, Madison, WI, EUA). Todos os blastômeros foram marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460 nm do microscópio de epifluorescência (BX 52, Olympus, Washington, EUA). As células em apoptose foram identificadas no filtro de 520 ± 20 nm (cor verde pela absorção da fluoresceína). As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). O número total de células e o número de células apoptóticas foram analisados pelo programa Image J. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células contendo corpos apoptóticos. Os dados foram avaliados por ANOVA e SNK. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a exposição dos embriões às NFCs e aos MWCNT-COOHs por 72h não foram observadas diferenças no número total de células ($P=0,91$), número de células apoptóticas ($P=0,89$) ou índice apoptótico ($P=0,82$) quando comparado ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito das NFCs e dos MWCNT-COOHs (0,2 µg ml⁻¹) após 72 horas de exposição no número total de células e apoptose em embriões produzidos *in vitro*

Grupos	N	Total de células*	Células apoptóticas*	Índice apoptótico
Controle	19	130,88±5,59	13,22±1,05	10,28±2,83
NFC	16	126,06±6,93	14,43±1,62	11,46±3,57
MWCNT-COOH	16	127,81±8,04	14,37±1,99	10,28±1,51

*ANOVA. Não houve diferença no número total de células ($P=0,91$), número de células apoptóticas ($P=0,89$) e índice apoptótico ($P=0,82$) entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

Na Figura 1 estão representadas as imagens dos blastocistos submetidos à técnica de TUNEL após contato com os NMs.

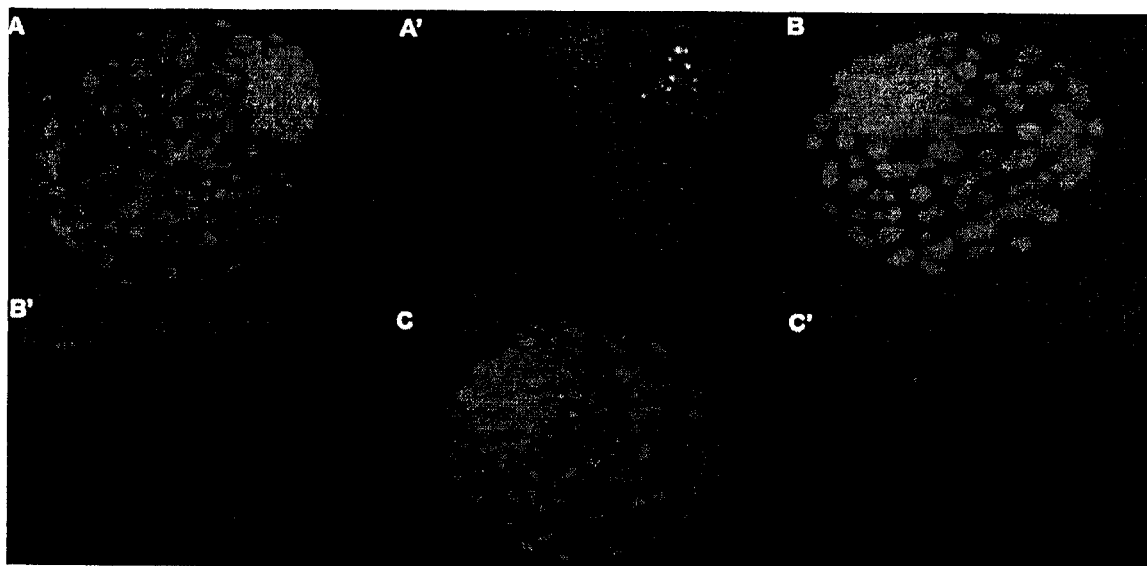


Figura 1. Detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos. Ilustrações A, B e C - Blastocistos com blastômeros marcados pelo DAPI e visualizados em azul (460nm). Ilustrações A', B' e C' - Blastocistos com blastômeros corados pela fluoresceína e visualizados em verde ($520\pm 20\text{nm}$), indicando apoptose. Grupos - A/A' (grupo controle); B/B' ($0,2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC); C/C' ($0,2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH) - Aumento: 100X.

3.1 Efeito dos nanomateriais no número total de células embrionárias

Dentre os períodos críticos de desenvolvimento de um organismo destaca-se a fase pré-implantacional, possivelmente devido à existência de células ainda indiferenciadas. Um distúrbio nesta etapa pode causar falhas na implantação ou levar a danos nos processos de divisão celular e diferenciação que originarão os tecidos fetais (ZALGĖVIČIENE et al., 2012). De acordo com os dados obtidos (Tabela 1) a adição de NFC ou MWCNT-COOHs no meio de cultura embrionário não alterou o número total de células que representa um importante parâmetro na avaliação da qualidade de embriões.

3.2 Efeito dos nanomateriais no índice apoptótico

A apoptose embrionária pode ocorrer pelo estresse provocado pelo sistema de cultura *in vitro*, porém, acomete embriões em baixas taxas sendo considerada um processo normal de desenvolvimento. Por isso, tanto embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro* apresentam em média até 20% de blastômeros em processo de morte celular (PEREIRA et al., 2010b). No presente estudo, os índices apoptóticos não ultrapassaram os valores encontrados na literatura (Tabela 1).

Estudos anteriores demonstraram aumento na apoptose em embriões expostos aos MWCNTs na mesma concentração e tempo de exposição ($0,2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ por 72h) do presente trabalho (PEREIRA et al., 2010a). Contudo, neste estudo anterior, a indução da apoptose foi atribuída principalmente a baixa pureza (81%) desses NTCs. No presente trabalho foram utilizados MWCNT de alta pureza (93%). Portanto, esses achados controversos podem ser explicados principalmente pela natureza química dos diferentes NTCs. Com relação às NFC, este material também não causou impacto nos parâmetros de qualidade embrionária avaliados. Possivelmente, o caráter biodegradável, a flexibilidade e a constituição química das NFCs (KOLAKOVIC et al., 2011) parecem ser determinantes na sua biocompatibilidade em embriões bovinos.

4 CONCLUSÃO

Na concentração avaliada, as NFCs e os MWCNT-COOHs não alteraram a cinética de desenvolvimento e sobrevivência embrionária de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MPI Rede Agronano – Embrapa. À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES04/CIH-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede Agro-Nano, Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) e ao Laboratório de Nanomateriais da UFMG.

REFERÊNCIAS

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. *AAPS PharmSciTech*, Springer, v.12, n. 4, p. 1366-1373, 2011.

LEIDENFROST, S.; BOELHAUVE, M.; REICHENBACH, M.; GÜNGÖR, T.; REICHENBACH, H.D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; HABERMANN, F.A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22121, 2011.

LING, M.P.; LIN, W.C.; LIU, C.C.; HUANG, Y.S.; CHUEH, M.J.; SHIH, T.S. Risk management strategy to increase the safety of workers in the nanomaterials industry. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 229-230, p. 83-93, 2012.

PEREIRA, M.M.; BRANDÃO, H.M.; BARBOSA, N.R.; SERAPIAO, R.V.; CARVALHO, B.C.; CAMARGO, L.S.A.; LADEIRA, L.O. Gene expression and apoptosis in bovine preimplantation embryo exposed to carbon nanotubes. In: *NANOAGRI, 2010. São Pedro. Anais...* International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, 2010a. p. 238-238.

PEREIRA, M.M.; MACHADO, M.A.; COSTA, F.Q.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, Csiro Publishing, v. 22, n. 7, p. 1074-1082, 2010b.

ZALGEVIČIENĖ, L.; KULVIETIS, V.; BULOTIENĖ, D.; DIDŽIAPETRIENĖ, J.; ROTOMSKIS, R. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. *Medicina (Kaunas)*, v. 48, n. 5, p. 256-264, 2012.