

Nanotoxicologia: Uma Área Emergente

Nanotoxicology: An Emergent Area

Ladeira R.¹, Veiga F.^{1,2}, Figueiras A.^{1,2}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

A nanotecnologia, onde se inserem as NPs, é uma das áreas mais importantes no desenvolvimento da Indústria Farmacêutica. Sendo as NPs pequenos transportadores onde pelo menos uma das dimensões físicas se encontra entre 1-100 nm, estas contribuem para uma melhoria das características biofarmacêuticas dos princípios ativos. Diversos fatores contribuem para a toxicidade de uma NP, de onde se pode destacar, sem dúvida, a dose administrada, mas também o tamanho e área de superfície, as características da superfície, a estabilidade e a via de exposição. Para que se possa avaliar adequadamente o comportamento das NPs, podem ser realizados estudos *in vitro*, em culturas celulares, ou *in vivo*, em animais. Numa situação ideal, apenas seriam utilizadas as culturas celulares, por todas as questões éticas e morais associadas ao uso de animais. No entanto, atualmente, esta situação não se verifica, pois ainda não se estabeleceu uma correlação *in vivo/in vitro* adequada. O comportamento das NPs acima mencionado corresponde às suas características farmacocinéticas, no que diz respeito à Absorção, Metabolização, Distribuição e Eliminação. Se se entender como é que a partícula se comporta dentro do organismo, e em contacto com os vários fluidos, a compreensão dos seus mecanismos de toxicidade é simplificada. Para finalizar, serão apresentados exemplos práticos de toxicidade de medicamentos já comercializados com lipossomas, NPs poliméricas e metálicas e micelas poliméricas. O efeito secundário mais comum é, de facto, as reações de hipersensibilidade, que podem e devem ser prevenidas com a utilização de anti-histamínicos.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Nanotoxicologia, Nanopartícula, Toxicidade, ADME.

ABSTRACT

Nanotechnology, where NPs can be put in, is one of the most important areas in the development of the Pharmaceutical Industry. As NPs are characterized as small transporters in which, at least, one of the physical dimensions is between 1-100 nm, they certainly lead to an improvement in the biopharmaceutical characteristics of the active ingredients. Many factors can contribute the toxicity of a NP. The dose is undoubtedly the most important one, but we can also mention others like the size and the surface area, surface characteristics, stability and route of exposure. To better assess the behaviour of a NP, two types of studies can be implemented – the *in vitro* studies, with cellular cultures, or the *in vivo* studies, with animals. Ideally, only cellular cultures should be used, because of the moral and ethics issues associated to the animal use in such studies. However, nowadays, that does not happen, as an adequate *in vivo/in vitro* correlation has not been established yet. The above-mentioned behaviour of the NPs is no more than their pharmacokinetic characteristics regarding Absorption, Metabolism, Distribution and Elimination. If we comprehend how a NP behaves inside the organism, and in contact with the various biological fluids, the understanding of its toxicity mechanisms is simplified. Finally, several practical examples of the toxicity of already commercialized medicines with liposomes, polymeric and metallic NPs and polymeric micelles are presented. The most commonly reported adverse effect is hypersensitivity reactions, which can and should be prevented with the use of antihistamines.

Keywords: Nanotechnology, Nanotoxicology, Nanoparticle, Toxicity, ADME.

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

² REQUIMTE/LAQV, Grupo de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Autora para correspondência: Ana Rita Figueiras, Professora Auxiliar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, tel.: +351 239488400; Fax: +351 239488503; rfigueiras@ff.uc.pt.

Submetido/Submitted: 25 novembro 2019 | Aceite/Accepted: 02 dezembro 2019

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma das áreas mais importantes do desenvolvimento industrial do século XXI e tem os seus pilares na pesquisa e no desenvolvimento de sistemas, recorrendo a técnicas que permitam a organização dos materiais em escalas nanométricas¹.

As nanopartículas (NPs) são nanomateriais em que pelo menos uma das três dimensões físicas se encontra entre 1-100nm¹. A sua aplicação está distribuída pelas mais diversas áreas, desde a cosmética à indústria têxtil, sendo o seu principal campo de aplicação a indústria farmacêutica. Dentro desta, estes nanomateriais contribuem para a melhoria das características biofarmacêuticas dos princípios ativos, permitindo atingir alvos terapêuticos específicos e até controlar perfis de libertação^{2,3}.

Podem ser utilizados diversos materiais no fabrico destas partículas nanométricas, nomeadamente o carbono, alguns metais e respetivos óxidos, polímeros e materiais semicondutores^{2,3}.

Considerando a imensidade de campos de aplicação das NPs assim como o elevado número de materiais que podem ser incluídos nestas, é imperativo o estudo dos mecanismos toxicológicos que lhes são inerentes, bem como a sua interação com o corpo humano. A nanotoxicologia é, portanto, o ramo da toxicologia que avalia o perfil toxicológico das nanopartículas nos organismos e nos ecossistemas, estudando os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade das partículas nestes^{2,3}.

Há muitos fatores que contribuem para o perfil toxicológico de uma NP. Entre eles podem-se destacar o tamanho e área de superfície e a via pela qual houve

exposição. O tamanho e a sua área de superfície são as duas características mais determinantes do ponto de vista toxicológico, sendo que quanto menor for o tamanho da NP, maior a sua área de superfície e, portanto, maior a reatividade com os tecidos. Quanto à via de exposição, a inalatória é considerada a mais comum^{2,3}.

Os mecanismos de toxicidade destes nanomateriais ainda não se encontram bem conhecidos e identificados. Contudo, estudos em modelos animais sugerem que estes podem estar relacionados com a acumulação nos tecidos e posterior aumento do *stress* oxidativo, pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS)^{2,3}.

Esta monografia pretende reunir e clarificar a toxicidade de um conjunto de nanopartículas nos tecidos, avaliando os estudos *in vitro* e *in vivo* existentes, as relações que se podem estabelecer entre estes e a transposição para o ser humano. Para tal é essencial conhecer os diferentes modelos celulares e animais mais usados nestas pesquisas e perceber todo o percurso destas partículas até serem eliminadas, através do conhecimento da sua farmacocinética de Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME).

FATORES QUE AFETAM A TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs são cada vez mais utilizadas como alternativas eficazes por parte da indústria farmacêutica. Este crescente interesse na sua utilização levou também a um maior investimento no estudo dos efeitos nocivos que daí podem advir².

Para entender de que forma as NPs po-

dem induzir toxicidade nos tecidos, é importante perceber quais as características que mais contribuem para tal. Entendendo estes mecanismos é possível, numa fase posterior, adaptar essas características de forma a que estas induzam a menor toxicidade possível nos organismos.

As NPs são materiais muito complexos que se comportam de formas bastante disparees em função do ambiente físico-químico em que estão inseridas. No entanto, há um conjunto de características que devem ser tidas em consideração aquando do estudo da nanotoxicidade, como o tamanho e a área de superfície, as características de superfície, a estabilidade da partícula, a presença de impurezas e a via pela qual ocorreu a exposição². Destas, o tamanho e a área de superfície são as características que mais contribuem para o perfil toxicológico, no entanto, todas elas estão dependentes de um fator que se lhes sobrepõe: a dose administrada^{2,5}.

A reduzida compreensão destes fatores e da interação das NPs com o organismo leva a que as correlações que se estabelecem apenas com base nestas características tenham um baixo valor preditivo, devendo ser sempre complementadas com ensaios toxicológicos mais específicos⁵.

O tamanho e a área de superfície são dois parâmetros que se relacionam e que variam de forma inversamente proporcional. Quanto menor for o tamanho maior área de superfície em contacto com o meio, o que resulta, em última análise, numa maior reatividade tanto intra como extracelular². NPs de menores dimensões, tendo uma maior área de superfície, induzem maiores níveis

de oxidação e de citotoxicidade⁶. Para além disso, partículas de tamanho mais reduzido conseguem atingir locais do organismo que, caso contrário, seriam inacessíveis⁷.

Relativamente às características da superfície, podem ser destacadas duas principais: a carga de superfície e a presença, ou não, de uma “coroa proteica”².

As NPs podem ter carga positiva, negativa ou neutra. A fim de perceber a forma como a carga de superfície pode estar na origem da toxicidade, é importante interiorizar que a membrana celular dos mamíferos tem carga de superfície negativa. Por conseguinte, as partículas catiónicas são mais rapidamente reconhecidas como corpos estranhos (dada a sua diferença na composição) levando a uma maior ativação do sistema imunitário⁷. Por outro lado, as partículas aniónicas entram mais facilmente para o meio intracelular, uma vez que a sua composição de superfície é semelhante à das células, induzindo toxicidade ao nível do DNA⁶. Podemos então concluir que NPs catiónicas induzem uma maior resposta por parte do sistema imunitário, com libertação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, enquanto que as aniónicas são reconhecidas pela sua citotoxicidade^{2,5}.

A “coroa proteica” consiste na adsorção de proteínas à superfície das NPs. Este fenómeno ocorre em maior extensão para partículas de elevada carga, sejam elas positivas ou negativas. As NPs envolvidas por coroa proteica induzem uma maior resposta imunitária, já que as proteínas séricas e plasmáticas aumentam a absorção fagocitária².

Também a estabilidade pode estar na origem da toxicidade. NPs química-

mente estáveis, como é o caso dos metais nobres, não estão tão associadas a incidentes quando comparadas a outros compostos mais reativos. Partículas mais reativas, como é o caso das de carbono e de óxidos de metais, têm uma maior tendência a formar aglomerados, tornando-as ainda mais reativas e tóxicas².

O mesmo se passa com a presença de impurezas. NPs impuras induzem uma maior ativação do sistema imunitário em comparação com as mesmas NPs purificadas².

A via de exposição à NP também é um fator de extrema importância dada a influência direta que tem na dose de partícula que entra na corrente sanguínea. A via pulmonar é a via de exposição mais comum, mas na grande maioria das vezes a NP não chega à corrente sanguínea, resultando apenas numa interação local. Pelo contrário, a via sistémica resulta numa interação generalizada onde a partícula pode facilmente atingir órgãos principais responsáveis pelo metabolismo, como o fígado, os rins ou o baço².

ESTUDOS *IN VITRO*

A expressão *in vitro*, que significa “num frasco de vidro”, é amplamente utilizada quando nos referimos a estudos e ensaios laboratoriais, que ocorrem fora do organismo, geralmente numa cultura de células.

O uso de ensaios *in vitro* para a realização de um estudo de nanotoxicidade tem vantagens associadas, em comparação com os ensaios *in vivo*. As principais vantagens para os investigadores são, sem dúvida, a eliminação das variáveis intrínsecas aos organismos

quando expostos a condições de *stress*, tendo o controlo absoluto do meio em que decorre o ensaio, desde as suas características físico-químicas (pH, temperatura) até às características fisiológicas, como a concentração de hormonas ou de nutrientes. A eliminação de todas estas variáveis assegura a obtenção de resultados mais reprodutíveis⁸. Para além disso, tanto a nível moral como ético, a utilização de culturas celulares é melhor aceite, não havendo a necessidade de expor animais a compostos potencialmente tóxicos². Por fim, é ainda importante referir as vantagens económicas deste tipo de testes, uma vez que, para além de proporcionarem resultados mais rápidos, exigem a utilização de menores volumes (de meios ou dos próprios compostos em estudo), contribuindo para um processo menos dispendioso^{2,8}.

Existem diversos tipos de ensaios que podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade das NPs. Entenda-se por citotoxicidade o conjunto de efeitos adversos que resultam da interação da célula com algo externo, neste caso uma NP. Estes efeitos podem, por sua vez, interferir com a viabilidade da célula e conduzir mesmo à ativação de mecanismos de morte celular. É importante referir que nem todos os compostos tóxicos induzem mecanismos que culminam na morte da célula, sendo que muitas vezes há apenas alterações a nível da sua viabilidade⁸.

Por conseguinte, muitos ensaios centram-se na avaliação direta ou indireta da viabilidade celular, ou seja, têm como finalidade a quantificação da percentagem de células viáveis após a exposição de toda a cultura celular aos compostos

em estudo⁸. O ensaio com o Brometo de Metil-Tiazolil-Tetrazólio (MTT), com o corante Vermelho Neutro ou com Diacetato de Diclorofluoresceína são alguns exemplos destes testes.

Ensaio com o MTT

Este ensaio utiliza como reagente um sal tetrazólico, o brometo de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT). O ensaio MTT é dos mais utilizados para avaliar a viabilidade celular eucariótica e bacteriana. Neste procedimento colorimétrico, os sais tetrazólicos são reduzidos a cristais de formazano, que têm cor roxa característica e podem ser posteriormente quantificados por absorvância^{2,9}. Esta redução é catalisada por desidrogenases e coenzimas intracelulares, entre as quais o NADPH, e é possibilitada pelo facto de o MTT ser um composto lipofílico que atravessa a membrana de células intatas. Desta forma, quanto maior for o número de células viáveis na cultura, maior será a quantidade de cristais formada e, conseqüentemente, maior a absorvância medida. Assim, quanto mais tóxica for uma NP para uma determinada cultura celular, menor será a absorvância medida no final do ensaio⁹. Quando aplicado à avaliação de NPs, este ensaio pode ter como desvantagem a absorção de cristais de formazano por estas, conduzindo a falsos positivos².

Ensaio com o Vermelho Neutro

Este ensaio também avalia a viabilidade de culturas celulares, utilizando como reagente um corante e indicador de pH, do tipo eurodina, designado de Vermelho Neutro, que atravessa a membrana das células saudáveis, por difusão e que é, posteriormente, armazenado nos li-

ssossomas. É possível quantificar o corante incorporado por espectrofotometria recorrendo a uma curva de dose resposta elaborada a partir de padrões^{2,10}. Como indicador de pH, o vermelho neutro apresenta-se amarelo para valores superiores a 8, contrastando com a cor vermelha em meios ácidos, como o meio lisossomal¹⁰.

A interação das células com compostos potencialmente tóxicos altera as características das membranas celulares e lisossomais, resultando numa menor incorporação do corante. Desta forma, quanto maior for a absorvância medida no espectrofotómetro, maior terá sido a incorporação do corante e, portanto, menos tóxico o composto em análise. Pelo contrário, valores de absorvância mais reduzidos estão relacionados com toxicidade superior¹⁰.

Citometria de Fluxo com o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Este método é utilizado para medir o *stress* oxidativo da célula provocado pelas ROS^{2,11}. Estas são naturalmente formadas no meio celular, sendo posteriormente eliminadas por mecanismos apropriados. Quando é ativado algum tipo de mecanismo de defesa intracelular, por exemplo em consequência da exposição das células a partículas tóxicas, este equilíbrio é posto em causa, resultando num aumento de ROS¹². Desta forma, quanto maior for a toxicidade do composto em estudo, maior a quantidade de ROS formadas dentro da célula. Para avaliar este aumento é utilizado o diacetato de diclorofluoresceína, uma sonda química que adquire fluorescência na presença de ROS. Esta sonda é posteriormente quantificada num

aparelho adequado, sendo que quanto maior o número de partículas de DCFH-DA, maior terá sido a toxicidade à qual a célula esteve exposta^{11,13}.

De uma forma geral, os ensaios não estão desenvolvidos para o estudo de NPs, podendo haver ainda algumas lacunas, pelo que estes testes deveriam ser adaptados para a nanotoxicologia num futuro próximo, para que se assegurasse uma correlação *in vivo/in vitro* mais sólida e consistente⁸.

A escolha do tipo de cultura celular que será alvo de ensaio deve ser criteriosa, uma vez que diferentes culturas possuem diferentes características que podem interferir com os resultados do teste. É assim de extrema importância perceber as vantagens e desvantagens de cada modelo celular, para que sejam obtidos os melhores resultados⁸.

Existem dois modelos de culturas celulares: as culturas celulares primárias e as linhas celulares¹⁴.

Culturas celulares primárias

Como o próprio nome indica, as culturas celulares primárias são obtidas diretamente a partir dos tecidos dadores (animais ou humanos). A principal vantagem da utilização destas culturas prende-se com o facto de estas manterem as características morfológicas do tecido de onde provêm⁸. No entanto, para além de serem mais dispendiosas e difíceis de obter, são culturas muito instáveis e com tempo de vida finito, o que torna os resultados obtidos mais difíceis de reproduzir¹⁴.

Vários investigadores recorrem a culturas primárias para avaliarem a citotoxicidade das NPs que estudam. Um exemplo disso é Kim *et al.*, que avaliou

a toxicidade pulmonar de NPs de zinco numa cultura primária de células epiteliais de rato^{8,15}.

Linhas celulares

A partir do momento em que uma cultura celular primária é sujeita a alguma alteração, como o subcultivo, passa a ser designada de linha celular⁸.

As linhas celulares são culturas muito mais estáveis e têm como vantagem uma capacidade de replicação ilimitada, razões que levam a que sejam mais vezes escolhidas. No entanto, as suas características não são tão semelhantes às dos tecidos *in vivo*, como acontece com as culturas primárias¹⁴.

Na tabela 1 está sumariada a informação relativa a linhas celulares usadas na avaliação da nanotoxicidade de partículas.

Tabela 1. Linhas celulares usadas em Nanotoxicologia¹⁶⁻¹⁹

Animal	Tecido	Célula	Linha celular
Rato	Pulmão	Epitelial	RLE-6TN
			L2
	Renal	NRK52E	
Murgancho	Embrionário	Fibroblasto	NIH-3T3
	Sangue	Macrófago	RAW264.7
Cão	Renal	Epitelial	MDCK
		Mesangial	IP15
	Renal	Epitelial	HK-2
Humano	Pulmão	Epitelial	A549
	Sangue	Monócitos	THP-I

ESTUDOS *IN VIVO*

A expressão *in vivo* deriva do latim e significa “dentro do vivo”, abrangendo todo e qualquer ensaio ou avaliação que ocorra utilizando um organismo vivo.

Ao contrário dos estudos nanotóxi-

cológicos em culturas celulares, aqueles que são realizados em organismos vivos permitem uma perspectiva global e integrada dos efeitos biológicos das NPs num órgão ou tecido específicos. Para além disso, é possível ainda avaliar as consequências da sua interação com componentes biológicos como o sistema imunitário⁸.

Outra vantagem facilmente reconhecida na utilização de organismos vivos é o facto de permitirem a quantificação da farmacocinética das partículas. Só depois de se compreender o comportamento da NP no que diz respeito à sua absorção, distribuição, metabolização e eliminação dentro de um organismo, é possível o cálculo da dose ótima a administrar em humanos. No entanto, é importante referir que, mesmo em ensaios *in vivo*, os resultados podem ser dispares, uma vez que são facilmente afetados pelo tipo de organismo e pelo teste aplicado, devendo, por isso, ser feita uma escolha criteriosa de ambos antes de se avançar com qualquer estudo^{2,20}. A fim de se conseguir uma maior uniformidade de resultados dentro da comunidade científica através da comparação e discussão da nanotoxicidade de diferentes materiais, era importante a criação de *guidelines* que auxiliassem esta avaliação, para que todos os compostos fossem avaliados dentro das mesmas condições, previamente avaliadas e aprovadas².

A principal desvantagem deste tipo de estudos é a manipulação de seres vi-

vos, na medida em que os animais continuam sujeitos a condições de *stress* apesar de toda a regulamentação que já existe sobre este assunto, mantendo-se assim as questões de origem ética e emocional. Atualmente não é possível utilizar apenas culturas celulares para estudar a segurança de qualquer tipo de xenobiótico sem que os ensaios tenham sido anteriormente validados através da obtenção de resultados semelhantes em animais, o que na atualidade não se verifica com as NPs. Esta falha na transposição de resultados pode ser devida à mudança das características físico-químicas da própria NP quando dentro do organismo, mas também pode estar relacionada com erros que se cometem nos ensaios *in vitro*, como o uso de doses demasiado elevadas que nunca seriam atingidas, em proporção, num animal². A via de administração também é igualmente importante, já que poderá levar a extensões de absorção diferentes³.

Desta forma, apesar de os estudos *in vivo* serem mais caros, morosos e eticamente questionáveis são, até à data, indispensáveis para a avaliação do comportamento das NPs³.

Os principais órgãos envolvidos na toxicidade das NPs são os pulmões, o fígado, os rins e o baço, pelo facto de desempenharem funções essenciais a nível fisiológico³. De seguida serão discutidos os diversos mecanismos de nanotoxicidade a nível pulmonar, hepático, renal e esplénico, baseados num conjunto de ensaios *in vivo*, resumidos na tabela 2.

Tabela 2. Ensaios in vivo com nanopartículas²¹⁻³³

Fonte	Objetivo do estudo	Nanopartícula	Condições	Animais	Resultados
Toxicidade Pulmonar					
Sisler <i>et al.</i> , 2016	Avaliar os efeitos pulmonares consequentes da inalação de NPs de Monóxido de Cobalto (CoO) e de Óxido de Lantânio (La ₂ O ₃) em murganhos.	CoO La ₂ O ₃	Os murganhos foram expostos a vários tipos de ar, durante 4 dias (sendo depois devidamente analisados 1 hora e 1, 7 e 56 dias após a exposição): - Ar filtrado (Controlo); - Ar contaminado com 10 ou 30 mg/m ³ de NPs de CoO (Teste); - Ar contaminado com 10 ou 30 mg/m ³ de NPs de La ₂ O ₃ (Teste).	Murganhos	A % de CoO após a primeira hora foi bastante superior à de La ₂ O ₃ ; no entanto, após os 56 dias a % de CoO era residual enquanto que a de La ₂ O ₃ se manteve. Desta forma, concluiu-se que o CoO induz maior toxicidade aguda, enquanto que La ₂ O ₃ se relaciona mais com toxicidade crónica. Ambas as NPs induziram um aumento da LDH e do número de leucócitos e citocinas (IL-1β, TNFα, IL-6) no fluído broncoalveolar.
Han <i>et al.</i> , 2016	Avaliar os efeitos tóxicos de vários tipos de NPs de Sílica (Si) em murganhos, após administração intranasal.	Si	Administração intranasal dos vários tipos de NPs de Si (esféricas, mesoporosas, conjugadas com polietilenoglicol ou com a ovalbumina), 3 vezes por semana, durante 2 semanas, com consequente avaliação dos resultados.	Murganhos	Houve um aumento da resposta inflamatória com todas as NPs (quer devido ao aumento da concentração de IL-5, IL-13, IL-1β, e IFN-γ, quer devido ao aumento do número de células inflamatórias). As NPs mesoporosas foram aquelas que induziram uma maior resposta e as conjugadas com polietilenoglicol as menos tóxicas.

<p>Park et al., 2015</p>	<p>Avaliar os efeitos da inalação de NPs de Cobre (Cu) em murganhos asmáticos.</p>	<p>Cu</p>	<p>O estudo está dividido em duas fases principais: na primeira (Controlo) são estudados os efeitos nos murganhos saudáveis, enquanto que na segunda fase (Teste) é induzida asma nos animais e são avaliados os mesmos efeitos, nas mesmas condições. Em ambas as fases, os animais estão divididos em 4 grupos, que recebem 0, 25, 50 e 100 µg/kg da nanopartícula numa solução de PBS (Phosphate Buffered Saline), durante 3 dias.</p>	<p>Murganhos</p>	<p>A exposição a estas NPs levou a um aumento da resposta inflamatória pulmonar, consequência de uma elevação das citocinas pró-inflamatórias, e de ROS, todos mediadores estimulatórios de neutrófilos. Nos animais asmáticos verificou-se uma maior concentração de eosinófilos. Consequentemente, a exposição a estas NPs e o consequente aumento de células inflamatórias, agravam a hiper-responsividade brônquica e a produção de muco, piorando o quadro de asma.</p>
<p>Ko et al., 2018</p>	<p>Avaliar o agravamento de lesões pulmonares, previamente induzidas, após a administração intranasal de NPs de Dióxido de Silício (SiO₂) em murganhos.</p>	<p>SiO₂</p>	<p>Neste estudo, os animais foram divididos em dois grupos: - o grupo Teste foi tratado previamente com lipopolissacarídeo, um composto que origina lesões pulmonares. - o grupo Controlo não foi previamente tratado com qualquer substância. De seguida, foi administrada a NP aos dois grupos, por via intranasal.</p>	<p>Murganhos</p>	<p>A exposição a estas NPs levou a um aumento do número de células pró-inflamatórias e de citocinas no fluido broncoalveolar. Estas mudanças ocorreram tanto no grupo Controlo como no grupo Teste. Nos animais com lesão pulmonar prévia, houve um efeito sinérgico.</p>

Toxicidade Hepática					
Kumari <i>et al.</i> , 2014	Avaliação da toxicidade de NPs de Óxido de Cério (CeO ₂) em ratos Wistar após uma dose única, administrada por via oral.	CeO ₂	Os ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: o grupo de controlo positivo, o de controlo negativo e o experimental. O grupo experimental foi posteriormente dividido em outros três grupos que receberam diferentes doses da NP (100, 500 e 1000 mg/kg peso corporal). Os animais foram expostos a uma dose única e posteriormente sacrificados para avaliação dos resultados.	Ratos	Os ratos que receberam a dose mais alta de CeO ₂ , apresentaram necrose em algumas zonas do tecido hepático aquando da avaliação histológica. Quanto aos parâmetros bioquímicos verificou-se um aumento da ALP, da LDH e da GSH.
Jia <i>et al.</i> , 2017	Avaliação da toxicidade hepática após administração oral de NPs de Prata (Ag) em murganhos com excesso de peso induzido.	Ag	Os animais foram divididos em 2 grupos, Teste e Controlo. Os primeiros foram alimentados com uma dieta normal, enquanto que os segundos foram alimentados com uma Dieta Rica em Gordura, durante 8 semanas. Após este período, foi-lhes dado, por via oral, 100 ou 300 mg/kg de uma solução aquosa da NP, diariamente por um período de 14 dias. Os resultados foram avaliados.	Murganhos	Após a análise histológica, verificou-se uma acumulação das NPs em todos os órgãos maioritários. No entanto a acumulação hepática foi muito superior. Houve um aumento de GSH bem como de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, e fator de necrose tumoral) e de esteatose. Nos animais obesos, as NPs potenciaram a esteatose já pre-existente.
Shakeel <i>et al.</i> , 2016	Avaliação dos efeitos tóxicos a nível hepático e sanguíneo após a administração subcutânea de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) em ratos.	TiO ₂	Os animais foram divididos em 4 grupos, a cada um dos quais foi administrada, subcutaneamente, uma concentração da NP (0, 50, 100 or 150 mg/kg de peso corporal), em dias alternados, durante 28 dias.	Ratos	Comparativamente ao grupo controlo (0 mg/kg de NP), os grupos experimentais apresentaram: - níveis elevados de ALT, AST e ALP - diminuição da atividade das enzimas: CAT, SOD e GST.

Toxicidade Renal					
Chen et al., 2015	Observar a toxicidade renal aguda, após a administração intraperitoneal de NPs de Sílica (Si) a murganhos.	Si	Os animais foram divididos em 2 grupos e receberam, intraperitonealmente, diferentes doses da NP: 150, 300, ou 600 mg/kg de peso corporal. Após a administração, os animais sofreram eutanásia, para que os resultados fossem avaliados. O primeiro grupo 2 dias após a administração e o segundo 12 dias após a administração.	Murganhos	Dois dias após a exposição é possível observar fibrose nos tecidos intersticiais. Verificou-se também um aumento de mediadores de inflamação que culminam no aumento dos marcadores de fibrose, entre eles o NF-κB.
Rana et al., 2017	Avaliar a toxicidade renal de NPs de Sulfato de Cádmio (CdS), após administração por sonda, a ratos.	CdS	Os ratos receberam, em dias alternados, durante 45 dias, a dose de 10 mg/kg de peso corporal da NP. Após a administração, foram avaliados os resultados.	Ratos	Observou-se a nível renal: aumento da peroxidação lipídica e de H ₂ O ₂ bem como um aumento da concentração de creatinina na urina. Verificou-se ainda perda de fosfatase alcalina, o que confirma a toxicidade renal para além do aumento do stress oxidativo renal, através do aumento de ROS.
Fontana et al., 2014	Avaliação da toxicidade renal de NPs de Paládio (Pd) após injeção de uma solução com a NP a ratos.	Pd	Os ratos foram divididos em 5 grupos, sendo um deles o grupo controlo, e receberam 0,012, 0,12, 1,2 ou 12 mg/kg de peso corporal da NP.	Ratos	Verificou-se um aumento significativo tanto de Proteínas de Ligação ao Retinol como de β ₂ -Microglobulina na urina, indicativo de lesão renal.
Huang et al., 2014	Avaliação da toxicidade renal de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) por instilação a murganhos.	TiO ₂	Os animais receberam doses da NP que variaram entre 0,1, 0,25, and 0,5 mg/semana, durante 4 semanas.	Murganhos	Os efeitos tóxicos da NP foram dose-dependentes. Observou-se precipitação renal da NP para a dose maior, marcadores de stress oxidativo (ROS) e de fibrose incluindo: nitrotirosina, fator de hipoxia induzível 1α (HIF-1α), fator de crescimento β (TGF-β) e colagénio II.

Toxicidade Esplénica					
Abass <i>et al.</i> , 2017	Avaliar a toxicidade no baço e no timo de NPs de Óxido de Zinco (ZnO), após administração oral a ratos.	ZnO	Os animais foram divididos em 2 grupos: o grupo controlo e o grupo teste (que recebeu o tratamento com a NP). Os animais pertencentes ao grupo teste receberam uma dose de 350 mg/kg de peso corporal da NP. Posteriormente, os resultados foram avaliados.	Ratos	Observou-se um aumento significativo de: - TNF- α , INF-c) e citocinas pró-inflamatórias. Histologicamente, os tecidos dos animais no grupo teste apresentavam alguma degeneração como atrofia da polpa branca, aparecimento de vacúolos e apoptose de alguns esplenócitos.
Sheng <i>et al.</i> , 2014	Avaliação da toxicidade esplénica de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) após administração intragástrica a murganhos.	TiO ₂	Os animais receberam doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de peso corporal, por via intragástrica, durante 9 dias consecutivos. Após este tempo foram avaliados os resultados da toxicidade ao nível do baço.	Murganhos	Quanto maior a dose de NP, menor o número de glóbulos brancos e vermelhos, linfócitos, neutrófilos, plaquetas, hemoglobina, CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e células B. Na análise histopatológica do tecido é possível observar acumulação da NP bem como alteração da morfologia dos esplenócitos.

Para o desenrolar destes estudos nanotoxicológicos são necessários animais. Diferentes espécies podem ser utilizadas, sendo que a escolha irá depender não só do tipo, mas também das condições económicas do estudo. Alguns exemplos são os murganhos, ratos, coelhos ou os suínos, no entanto, os roedores (quer murganhos, quer ratos) são a classe mais utilizada⁸.

Toxicidade pulmonar

O pulmão é uma das maiores portas de entrada para NPs estando, assim, muito suscetível à sua toxicidade, apesar de to-

dos os mecanismos de defesa inerentes, como a tosse ou o espirro³⁴.

O principal mecanismo de toxicidade pulmonar das NPs é a inflamação descontrolada, que se traduz no aumento de citocinas pró-inflamatórias. A inflamação crónica pode facilmente culminar no aparecimento de fibrose pulmonar, já que muitas das citocinas que se encontram elevadas são também mediadores pró-fibróticos cuja função é o aumento do número de fibroblastos que contribuem para a sua formação^{2,21-24}.

Para além da inflamação, uma resposta natural do sistema imunitário, as NPs

podem também induzir *stress* oxidativo pelo aumento de ROS. Esta situação deve-se ao facto de as NPs terem uma grande reatividade com as moléculas do meio, devido à elevada área de superfície, o que provoca um aumento de ROS que a célula não consegue eliminar com os seus mecanismos antioxidantes²¹⁻²⁴.

A lesão celular pode ser avaliada através da quantificação da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima intracelular que participa no metabolismo da glicose e é libertada para o espaço intersticial nestas situações²¹⁻²⁴.

Park *et al.* estudou o efeito da inalação de NPs de cobre em murganhos asmáticos e verificou que, neste grupo, o quadro de inflamação era exacerbado e hiper-responsivo, agravando a sintomatologia da doença²³. Por conseguinte, também outras doenças do foro cardiorrespiratório estarão agravadas em casos semelhantes a este, uma vez que se verifica, a longo prazo, uma diminuição da função pulmonar³.

Toxicidade Hepática

O fígado é um órgão que desempenha diversas funções, principalmente a nível metabólico. É o segundo maior órgão do corpo humano e é neste que a grande maioria dos compostos, nomeadamente as NPs, sofre metabolização, tornando-o por isso num ponto de passagem obrigatória³. Desta forma, também deve ser considerado nos estudos de nanotoxicidade, pois tanto o contacto direto com as partículas como a sua deposição nos tecidos hepáticos podem ser potenciadores de efeitos nocivos²⁶.

A toxicidade deste órgão pode ser avaliada através do controlo da função hepática, do *stress* oxidativo, da inflamação dos

tecidos e da presença de esteatose e necrose nos casos mais graves³.

O comprometimento da função hepática traduz-se no aumento de um conjunto de enzimas intracelulares na corrente sanguínea, que são libertadas para o exterior em situações de lesão tecidual: a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (ALP)²⁷.

As NPs também podem induzir toxicidade pela acumulação de ROS. Shakeel *et al.*, verificou que os animais expostos às doses mais elevadas da NP têm a atividade de enzimas fulcrais na metabolização de ROS diminuída, entre as quais a Superóxido Dismutase (SOD), que converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio, a Catalase (CAT), que conduz à formação de água a partir do peróxido de hidrogénio, e a Glutathione S-transferase (GST), que “recicla” a glutathione reduzida (GSH) a partir da sua forma oxidada. A diminuição da atividade destas enzimas, nomeadamente da GST, conduz ao aumento da forma oxidada da glutathione, levando a um aumento do *stress* oxidativo²⁵⁻²⁷.

Na inflamação, à semelhança do que acontece nos outros tecidos, há um aumento de citocinas pró-inflamatórias entre elas as interleucinas e o fator de necrose tumoral. Em casos extremos, esta inflamação pode levar à formação de esteatose - acumulação de gordura no fígado-, vulgarmente conhecida como “fígado gordo”. Esta situação pode dever-se à inibição, por parte dos fatores de necrose tumoral (nomeadamente o alfa), de um recetor responsável por induzir a peroxidação lipídica, o PPAR- δ . Assim sendo, se a peroxidação lipídica estiver comprometida, vai haver acumu-

lação de lípidos, o que origina a esteatose hepática²⁶.

Toxicidade Renal

A maioria dos resíduos metabólicos são eliminados através da urina, sobretudo os de menor tamanho. É, por isso, expectável que grande parte das NPs que entrem no nosso corpo sejam igualmente eliminadas por esta via. Para além de serem responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, os tecidos renais estão também muito suscetíveis à acumulação de NPs, sendo por isso inevitável o seu estudo toxicológico³.

Tal como em todos os órgãos, a toxicidade renal está relacionada com o aumento de mediadores inflamatórios, que podem culminar no aparecimento de fibrose^{3,28}. Para além disso, são facilmente observados marcadores de lesão renal, como o aumento de creatinina e de microglobulina na urina, indicativos de insuficiência renal aguda^{3,29,30}. Todos estes efeitos adversos são consequência do contacto das partículas precipitadas com os tecidos renais, que originam condições de *stress* oxidativo^{3,31}.

Toxicidade Esplénica

O baço é um órgão que combina funções do sistema linfático e do sistema imunitário. De uma forma sucinta, é constituído por duas polpas: a polpa branca, onde estão armazenados os linfócitos, e a polpa vermelha, responsável pelo controlo, armazenamento e destruição dos eritrócitos^{32,33,35}.

Tendo em conta que a maioria dos danos provocados pelas NPs tem subadjacente a inflamação, é de esperar que o baço também seja, de alguma forma, afetado por elas^{32,33}.

Sheng *et al.*, avaliou a toxicidade de NPs de dióxido de titânio e concluiu que doses elevadas se encontram relacionadas com uma diminuição do número de linfócitos e eritrócitos libertados na corrente sanguínea - o que indica toxicidade esplénica -, descrevendo ainda alterações morfológicas neste órgão consequentes da exposição³³.

FARMACOCINÉTICA DAS NANOPARTÍCULAS

Para uma melhor compreensão da forma como as NPs interagem com os tecidos alvo no corpo humano e, por conseguinte, originam nanotoxicidade, é importante perceber não só de que maneira estas atingem a corrente sanguínea e os tecidos, mas também como são metabolizadas e eliminadas.

Os efeitos toxicológicos de uma NP estão dependentes não só da dose administrada e do tempo de exposição, mas também da forma como esta interage com o organismo em questão³⁶.

Por possuírem características físico-químicas tão próprias, nomeadamente no que diz respeito ao seu tamanho nanométrico, as NPs têm um comportamento farmacocinético distinto das restantes partículas, o que leva a um perfil toxicológico muito característico e individualizado. Isto deve-se essencialmente ao facto de, ao apresentarem uma maior superfície de contacto, interagirem mais facilmente com o meio onde se encontram, seja este um tecido (saudável ou tumoral), um órgão ou um conjunto de tecidos e órgãos^{36,37}.

É nesta fase que se destaca a importância dos estudos farmacocinéticos, nomeadamente a avaliação da ADME, não só para se poder compreender os me-

canismos de toxicidade subadjacentes, mas também para os cálculos das doses que devem ser ministradas em função da via de administração³⁶.

Absorção

A absorção das NPs, que pressupõe a sua passagem através de uma barreira que separa o meio exterior da corrente sanguínea, está dependente das várias vias existentes, sendo umas mais comuns e importantes do que outras. No entanto, é importante referir que a grande maioria dos fármacos veiculados em NPs são administrados por via intravenosa, não se aplicando a etapa da absorção, razão pela qual a quantidade de estudos farmacocinéticos para as restantes vias não é abundante³⁷.

As principais vias após as quais pode ocorrer a absorção são a via oral, pulmonar e cutânea^{36,37}.

Após serem ingeridas, as NPs são absorvidas ao longo do trato gastrointestinal por diversos processos, nomeadamente o transporte paracelular, transcitose ou por endocitose nas células M. Como será de esperar, as características que as NPs apresentam irão ditar a extensão de absorção através destas vias, sendo o tamanho e a carga da partícula as propriedades mais significativas. Partículas mais pequenas e carregadas positivamente sofrem uma maior extensão de absorção comparativamente com partículas de tamanho superior ou com carga negativa ou neutra. A via oral é, sem dúvida, uma das vias mais significativas, dada a grande quantidade de fármacos que entram no organismo desta forma^{36,37}.

A via pulmonar não é tão usada como via de administração de medicamentos

compostos por NPs, no entanto, pode ser uma porta de entrada de NPs presentes no ar, em resultado da poluição atmosférica. Tal como para a via oral, as características físico-químicas das partículas têm influência na absorção pela via pulmonar. Mais de 80% das partículas inaladas que apresentem um tamanho inferior a 100 nm ficam retidas no trato respiratório, não sendo, por isso, absorvidas. Neste caso, também a frequência de respiração tem um papel importante³⁶.

A absorção cutânea, ou seja, através da pele, pressupõe a chegada das NPs a uma camada vascularizada, a derme, sendo necessária a passagem pela epiderme em primeiro lugar. A penetração das partículas pela epiderme está intimamente relacionada com a sua carga, sendo que partículas carregadas negativamente a conseguem penetrar, ao invés de partículas com carga neutra ou positiva³⁶.

Distribuição

Quando chegam à corrente sanguínea, as partículas vão distribuir-se pelos órgãos e tecidos em função das suas características e via de administração (oral, por inalação ou intravenosa). À semelhança do que acontece na absorção, a extensão da distribuição das NPs é inversamente proporcional ao tamanho da partícula e à sua ligação a proteínas plasmáticas, especialmente a albumina. A ligação das partículas a esta proteína resulta na redução da fração livre destas na corrente sanguínea, contribuindo para uma menor toxicidade³⁶.

O efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*) consiste no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos

que rodeiam um tumor, levando a uma maior retenção de moléculas nessas zonas, incluindo as NPs. Vários estudos sugerem que o efeito EPR varia de acordo com o tipo de tumor, podendo ter um papel importante na especificidade das NPs para os tecidos tumorais, permitindo assim uma distribuição específica sem causar toxicidade nos tecidos saudáveis. Atualmente, para permitir uma melhor especificidade das NPs para os tecidos, são incluídos constituintes proteicos na superfície da NP, que terão elevada afinidade para o tecido em causa³⁷.

A distribuição das partículas pode ainda ter subadjacente a sua passagem por membranas biológicas, como é o caso da barreira hematoencefálica. Para atravessar esta membrana por difusão passiva, a NP precisa de ter características muito específicas, nomeadamente no que diz respeito ao tamanho (< 500 Da) e afinidade para substâncias lipofílicas. As restantes partículas só conseguem trespassar a membrana caso sejam substratos para os transportadores lá existentes, permitindo uma travessia por difusão facilitada ou transporte ativo³⁶.

Metabolismo

A metabolização das NPs acontece no fígado por intermédio das enzimas hepáticas³⁶. Este processo consiste numa série de reações catalisadas por enzimas que permitem a adição e/ou criação de grupos funcionais, tornando os compostos mais polares e, desta forma, mais facilmente eliminados.

Mais uma vez, a capacidade de metabolização no corpo humano e a forma como ocorre está relacionada com as características físico-químicas da partícula³⁶. No entanto, o processo de meta-

bolização pode ser um pouco complexo e imprevisível, uma vez que, dentro do corpo, estas características podem mudar devido a vários fatores, entre os quais o pH ácido. De qualquer modo, partículas formadas por compostos biodegradáveis (como é o caso das NPs lipídicas, proteicas ou de ácido poli(láctico co-glicólico) (PLGA)) são mais fáceis e rapidamente metabolizadas do que as formadas por compostos não biodegradáveis³⁷.

No caso de NPs formadas por compostos inertes, como é o caso do ouro, é provável que não ocorra a metabolização pelas enzimas hepáticas e que estas partículas sejam eliminadas sem serem metabolizadas³⁶.

Eliminação

A eliminação pode ocorrer por via renal, através da urina, ou por via biliar, através das fezes. Para além destas duas vias principais, podem ser consideradas outras vias de eliminação, como é o caso da excreção nas glândulas sudoríparas ou através do leite. No entanto, não existem estudos farmacocinéticos suficientes que as confirmem devidamente³⁶.

A eliminação por via renal é tão mais rápida quanto menor for o diâmetro das NPs, não se observando para partículas com diâmetro superior a 15 nm, cuja eliminação ocorre por via biliar. À semelhança da via renal (considerada a via de eliminação primária), a velocidade de eliminação biliar varia de forma inversa ao tamanho da partícula³⁷.

Podem ser aplicados modelos farmacocinéticos no estudo do comportamento de uma partícula, possibilitando uma previsão do seu comportamento no organismo, a fim de se tirarem conclusões

relativamente a doses terapêuticas ou tóxicas³⁷.

Estes modelos podem ser divididos em duas classes: compartimentais e de base fisiológica. Ambos se traduzem por equações matemáticas que relacionam a concentração da NP no organismo em função do tempo e podem ser obtidos com recurso a vários *softwares* informáticos³⁷.

Os modelos compartimentais (Figura 1) são modelos que representam, de uma forma simples, a passagem da partícula pelo organismo e têm na absorção o principal mecanismo subjacente a esta. São modelos mais simples que os de base fisiológica e têm a desvantagem

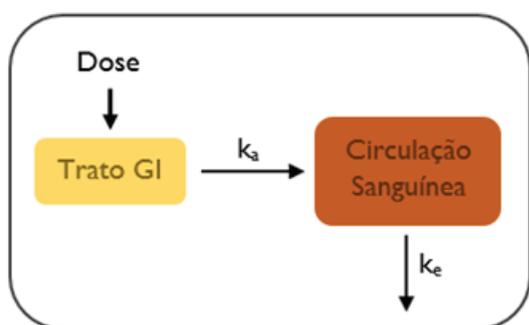


Figura 1. Modelo farmacocinético compartimental clássico (Adaptado)³⁸

de não considerarem outras variáveis que possam afetar a farmacocinética das partículas³⁸.

Os modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK) diferem dos modelos compartimentais clássicos na medida em que os primeiros consideram outros processos para além da absorção, como o trânsito gastrointestinal ou o fluxo sanguíneo³⁷. Nestes, todo o organismo é tido em atenção, sendo todos os órgãos/tecidos representados por um compar-

timento distinto. Nas extremidades podem observar-se 2 compartimentos de maiores dimensões: um referente ao sangue arterial que vai entrar nos diversos compartimentos e outro constituído pelo sangue venoso que sairá dos mesmos³⁸.

A Figura 2 é um exemplo de um modelo PBPK para coelhos, realizado com auxílio do *software* PK-Sim[®], onde é

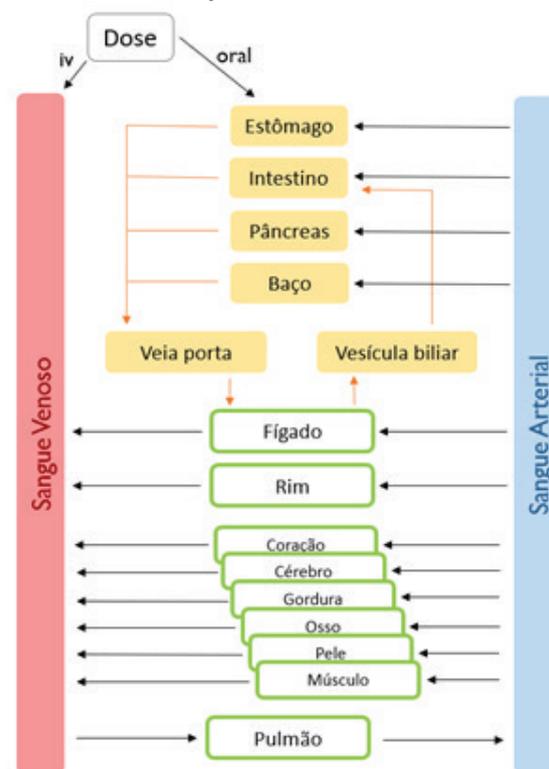


Figura 2. Exemplo de um modelo PBPK para coelhos elaborado com o *software* PK-Sim[®] (Adaptado)³⁹

possível observar o trajeto que uma NP percorreria por via oral e por via intravenosa.

Apesar de estes modelos serem mais sensíveis e específicos na previsão da concentração de partículas no organismo, quando aplicados às NPs podem estar sujeitos a algumas limitações, não só pelo facto de estas apresentarem um

comportamento farmacocinético particular em função da sua constituição, mas também devido à falta de dados farmacocinéticos na literatura³⁷.

TOXICOLOGIA DE NANOSSISTEMAS

Todas as investigações, ensaios e pesquisas têm como principal objetivo a obtenção de um produto que, dada a sua constituição, tenha os seus efeitos terapêuticos maximizados, com o mínimo de efeitos secundários associados. A utilização de NPs veio auxiliar esta conquista, uma vez que o aumento da área de superfície possibilita uma maior solubilidade do fármaco, em consequência do seu tamanho nanométrico⁴⁰.

Por tudo isto, a nanotecnologia e a obtenção de nanotransportadores tem vindo a crescer de forma exponencial nas últimas décadas, com mais de 100 produtos a serem aprovados para comercialização pela *Food and Drug Administration* (FDA)⁴⁰. Por conseguinte, e como já tem sido referido ao longo desta monografia, é igualmente importante perceber de que forma é que estes nanotransportadores podem induzir toxicidade no organismo, uma vez que não são totalmente inócuos.

Ao longo deste tópico irão ser abordados quatro tipos de NPs (lipossomas, NPs poliméricas e metálicas e micelas poliméricas) no que diz respeito à sua toxicidade.

Lipossomas

Os lipossomas são pequenas vesículas lipídicas que se podem dividir em dois grupos: os lipossomas unilamelares, constituídos por uma única bicamada fosfolipídica, permitindo a incorporação e transporte de fármacos hidrofílicos no

seu núcleo aquoso; e os multilamelares, mais completos e complexos, com duas bicamadas de fosfolípidos, onde podem ser incorporados tanto fármacos hidrofílicos (no núcleo), como lipofílicos (entre as bicamadas)⁴⁰.

Para além dos fosfolípidos, os lipossomas podem ter outras moléculas na sua constituição a fim de aumentar a estabilidade e a eficiência do nanotransportador. O colesterol e o polietilenoglicol (PEG) são dois constituintes muitas vezes incorporados nos lipossomas. O colesterol permite uma maior estabilidade da vesícula, uma vez que é intercalado entre as cadeias fosfolipídicas, impedindo assim a interação entre elas; e o PEG diminui o reconhecimento do lipossoma pelo sistema reticuloendotelial, quando inserido à superfície do transportador⁴¹. De acordo com os dados da FDA, os lipossomas são os nanomateriais mais utilizados, possuindo cerca de 30% deste mercado, e sendo o cancro a sua principal indicação terapêutica⁴¹.

Um exemplo de um fármaco lipossomal já inserido no mercado é o *AmBisome*[®] - nome comercial para a forma lipossomal da anfotericina B -, um antifúngico com largo espectro de ação⁴¹. Este fármaco é amplamente utilizado e muito menos tóxico quando comparado com a sua forma convencional (não lipossomal), podendo ser administrado por via parenteral. No entanto, apesar de eficaz, são reportadas com alguma frequência reações de hipersensibilidade ao lipossoma, manifestadas por desconforto abdominal e no peito ou dispneia, que cessam com o terminar da infusão ou com a administração de anti-histamínicos⁴². Nath *et al.* relata o caso de dois pacientes que desenvolveram reações de hi-

persensibilidade ao lipossoma após um tratamento com *AmBisome*[®]. Um dos pacientes manifestou problemas respiratórios enquanto que o outro demonstrou angioedema facial. Nesta sequência, teve de ser injetada uma mistura de adrenalina, difenidramina e hidrocortisona a ambos os doentes, para tratamento sintomático. Nath *et al.* conclui sublinhando que neste tipo de tratamento se deve garantir não só uma supervisão adequada, como o suporte necessário⁴³.

Nanopartículas Metálicas

As NPs metálicas podem ser puras ou oxidadas e foram inicialmente identificadas por Faraday, em 1857⁴⁴.

Podem ser atribuídas várias aplicações a estas NPs, não só ao nível do diagnóstico (agentes de contraste, por exemplo), mas também como agentes terapêuticos, uma vez que as suas ações anticancerígenas e antibacterianas estão comprovadas. Neste grupo incluem-se as NPs de prata, que são utilizadas no tratamento do cancro por induzirem o aumento da *p-53* e de ROS, ativando desta forma as vias de apoptose. Para além disso, as NPs de prata, bem como as de zinco, têm também reconhecidas as suas propriedades antibacterianas por mecanismos que não levam ao aparecimento de resistências⁴⁴.

Feraheme[®], um fármaco aprovado pela FDA em 2009, consiste numa formulação intravenosa de NPs de ferro e é utilizado no tratamento da anemia em adultos que apresentem deficiência férrea⁴⁰.

Apesar de imprescindível no tratamento da anemia, o *Feraheme*[®] é apontado como responsável por alguma imunotoxicidade em vários estudos, não se

conhecendo ainda o mecanismo pelo qual esta acontece. Esta situação foi comprovada por Shah *et al.*, que estudou o efeito do medicamento numa cultura primária de células T, observando uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento do stress oxidativo mitocondrial. De seguida, comparou o efeito imunotóxico do *Feraheme*[®] com o de outras formulações contendo ferro (*Venofer*[®], *Injectafer*[®] e *Ferlecit*[®]), tendo concluído que os danos mitocondriais com conseqüente comprometimento da função das células T são específicos do *Feraheme*[®]⁴⁵.

Nanopartículas Poliméricas

Alguns polímeros podem ser utilizados à escala nanométrica para a encapsulação de agentes terapêuticos graças à sua estabilidade gastrointestinal^{40,46}. Torna-se então possível que fármacos instáveis sejam administrados oralmente, já que ficam protegidos não só do pH gástrico, como também das enzimas digestivas⁴⁶. O tipo de polímero utilizado para encapsular um fármaco pode variar, existindo

Tabela 3. NPs Poliméricas⁴⁷⁻⁴⁹

Derivadas de Polímeros Naturais	Derivadas de Polímeros Sintéticos
Quitossano, Ácido Hialurónico, Alginato, Gelatina, Celulose, Ciclodextrina, Queratina, Colagénio, Hemoglobina, Albumina e Glúten.	PLGA, Policaprolactona (PCL), entre outros polipéptidos.

NPs derivadas de polímeros naturais e NPs derivadas de polímeros sintéticos, resumidos na Tabela 3⁴⁷⁻⁴⁹.

Estes nanotransportadores têm a vantagem de serem extremamente biocom-

patíveis e biodegradáveis, minimizando tanto a resposta imunológica como a acumulação no hospedeiro⁴⁸. Há que considerar, no entanto, que os polímeros naturais têm uma maior biocompatibilidade. Por outro lado, os sintéticos são mais versáteis, podendo ser utilizados em conjunto com outros componentes⁴⁹.

Como exemplo de um medicamento com este tipo de NP consideremos o *Neulasta*[®] - a forma peguilada do filgrastim. Este fator de crescimento de glóbulos brancos é utilizado no tratamento e na prevenção de neutropenias^{40,50}. A Neutropenia Febril (NF) associa a baixa contagem de leucócitos a elevadas temperaturas corporais e é um efeito adverso muito frequente nos doentes que recebem quimioterapia⁵¹.

Apesar de tudo, a dor nos ossos é frequentemente reportada como efeito adverso dos estimuladores da granulocitose, sendo a incidência destas notificações significativamente superior no caso do *Neulasta*[®]. Romeo, Li e Copeland apresentam, no seu trabalho de investigação, um *case report* onde o tratamento profilático com loratadina aliviou completamente a dor óssea associada ao *Neulasta*[®]. Sendo a loratadina um anti-histamínico, pode sugerir-se que o mecanismo da dor está relacionado com a libertação de histamina durante o processo inflamatório⁵².

Micelas Poliméricas

As micelas poliméricas são NPs esféricas de co-polímeros anfífilos. O seu núcleo hidrofóbico possibilita a incorporação de fármacos insolúveis em água, como é o caso do paclitaxel ou da doxorubicina⁴⁰. Este mesmo núcleo, ao fun-

cionar como reservatório do fármaco, previne fenómenos de opsonização e de adsorção que iriam diminuir a concentração do medicamento na corrente sanguínea⁵³. Por outro lado, o uso destas micelas como agentes solubilizantes diminui a toxicidade da formulação, uma vez que não há necessidade de utilizar compostos mais tóxicos⁵⁴.

As micelas são formadas termodinamicamente quando a concentração dos monómeros proteicos existentes no meio ultrapassa a *Concentração Micelar Crítica* (CMC). Nesta fase, os monómeros aglomeram-se e formam a micela⁵³. Sendo essencialmente utilizadas como transportadores de fármacos anticancerígenos, é um grande desafio avaliar a sua toxicidade isoladamente, já que os efeitos adversos da NP são facilmente mascarados pelos dos fármacos anticancerígenos. Com esta situação em mente, Kawaguchi *et al.* avaliou a toxicidade de micelas poliméricas vazias, concluindo que não provocavam qualquer anomalia patológica, apenas uma ativação transitória do sistema mononuclear fagocitário^{55,56}.

O paclitaxel (PTX) é um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento de várias formas de cancro, podendo ser utilizado tanto em tumores sólidos como disseminados, e tem tido um papel especialmente importante no cancro da mama e dos ovários⁵⁷. O *Taxol*[®], um medicamento já comercializado, consiste em micelas poliméricas com PTX. Apesar do seu largo espectro de atividade antitumoral, o *Taxol*[®] tem uma utilidade limitada como medicamento, devido às reações de hipersensibilidade provocadas pela micela. De forma a prevenir uma reação potencialmente fatal, todos

os pacientes em vias de receber tratamento com *Taxol*[®] deverão ser profilaticamente medicados com corticoides, antagonistas H2 e anti-histamínicos⁵⁷.

CONCLUSÃO

Vários fatores contribuem para a toxicidade das NPs, porém, a dose sobrepõe-se a todos os outros.

No que diz respeito à correlação *in vivo/in vitro*, verifica-se a existência de algumas lacunas nos ensaios *in vitro*, o que impede, por enquanto, a eliminação completa dos estudos em animais. Deve-se apostar numa maior regulamentação desta área, uniformizando os testes realizados nas NPs, para que se possam estabelecer perfis comparativos devidamente.

Ao avaliar o perfil toxicológico de diversas NPs, é possível encontrar alguns fatores comuns, apesar de ainda não se conseguir esclarecer com clareza o mecanismo de toxicidade pelo facto de existirem diversas características físico-químicas que podem ser alteradas quando a partícula entra no organismo. As reações de hipersensibilidade parecem ser o efeito adverso mais reportado em todas as NPs correspondendo a situações que podem e devem ser colmatadas com o uso de anti-histamínicos. No caso das NPs poliméricas, mais especificamente para o *Neulasta*[®], é ainda reportada dor nos ossos como efeito adverso à partícula.

A utilização de NPs como transportadores de fármacos é, sem dúvida, o futuro. Sendo uma área em constante crescimento e desenvolvimento, decerto que serão colmatadas todas as lacunas existentes no que diz respeito à regulamentação da área num futuro próximo, para que seja possível, a partir daí, retirar

conclusões mais fidedignas acerca dos mecanismos de toxicidade envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro de Fundos Nacionais (FCT/MEC, Fundação para a Ciência e Tecnologia/Ministério da Educação e Ciência) através do projeto UID/QUI/50006/2013, cofinanciado pela União Europeia (FEDER, através do acordo de parceria PT2020). Foi também suportado pelo FCT PTDC/BTM-MAT/30255/2017 (POCI-01-0145-FEDER-030255) da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) e pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER) através do programa COMPETE2020.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dalgleish T, Williams JMG, Golden AJ, Perkins N, Barrett LF, Barnard PJ. *Nanoethics and Nanotoxicology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
2. Saifi MA, Khan W, Godugu C. Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles. *Pharm Nanotechnol*. 2018. 6: 3-16.
3. Wu T, Tang M. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *J Appl Toxicol*. 2018. 38: 25-40.
4. Azhdarzadeh M, Saei AA, Sharifi S, Hajipour MJ, Alkilany AM, Sharifzadeh M, et al. *Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology*. *Nanomedicine*. 2015. 10: 31-52.
5. Talkar S, Dhoble S, Majumdar A, Patravale V. *Experimental Medicine and Biology: Transmucosal Nanoparticles: Toxicological Overview*. Mumbai, India: Department of Pharmaceutical Sciences and Technology, Institute of Chemical Technology; 2018.

6. Ajdary M, Moosavi MA, Rahmati M, Falahati M, Mahboubi M, Mandegary A, et al. Health Concerns of Various Nanoparticles : A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. *Nanomaterials*. 2018. 8: 1-28.
7. Adabi M, Adabi M, Naghibzadeh M, Adabi M, Zarrinfard MA, Esnaashari SS, et al. Biocompatibility and nanostructured materials : applications in nanomedicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017. 45: 833-42.
8. Durán N, Guterres SS, Alves OL. *Nanotoxicology: Nanomedicine and Nanotoxicology*. New York: Springer New York; 2014.
9. Stockert JC, Horobin RW, Colombo L, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018. 120: 159-67.
10. Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods Mol Biol*. 2017. 1601: 19-26.
11. Jemaà M, Fezai M, Bissinger R, Lang F. Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*. 2017. 43: 431-44.
12. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Front Physiol*. 2018. 9: 1-11.
13. Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen L, Szczepanowska J, Koopman W, Wieckowski M. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*. 2016. 109: 3-11.
14. European Collection of Authenticated Cell Cultures. *Fundamental Techniques in Cell Culture*. 3rd ed. Sigma-Aldrich; 2011.
15. Kim YH, Fazlollahi F, Kennedy IM, Yacobi NR, Hamm-Alvarez SF, Borok Z, et al. Alveolar Epithelial Cell Injury Due to Zinc Oxide Nanoparticle Exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010. 182 (11): 398-409.
16. Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol*. 2011. 8: 1-9.
17. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol*. 2011. 8: 1-10.
18. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*. 2009. 6: 1-12.
19. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*. 2007. 97: 163-80.
20. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity : the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007. 2: 565–71.
21. Sisler JD, Li R, Mckinney W, Mercer RR, Ji Z, Xia T, et al. Differential pulmonary effects of CoO and La2O3 metal oxide nanoparticle responses during aerosolized inhalation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2016. 13: 1-17.
22. Han H, Park YH, Park HJ, Lee K, Um K, Park J, et al. Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbu-

- min-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir Res.* 2016. 17: 1-10.
23. Park J, Lee I, Shin N, Jeon C, Kwon O, Ko J, et al. Copper oxide nanoparticles aggravate airway inflammation and mucus production in asthmatic mice via MAPK signaling. *Nanotoxicology.* 2015. 10: 445-52.
24. Ko J, Lee H, Shin N, Seo Y, Kim S, Shin I, et al. Silicon Dioxide Nanoparticles Enhance Endotoxin-Induced Lung Injury in Mice. *Molecules.* 2018. 23: 1-10.
25. Kumari M, Kumari IS, Kamal SSK, Grover P. Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014. 775-76: 7-19.
26. Jia J, Li F, Zhou H, Bai Y, Liu S, Jiang Y, et al. Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Ions May Aggravate Fatty Liver Disease in Overweight Mice. *Environ Sci Technol.* 2017. 51: 34-43.
27. Shakeel M, Jabeen F, Qureshi NA, Fakhr-e-Alam M. Toxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Titanium Dioxide Bulk Salt in the Liver and Blood of Male Sprague-Dawley Rats Assessed by Different Assays. *Biol Trace Elem Res.* 2016. 173: 405-26.
28. Chen X, Zhouhua W, Jie Z, Xinlu F, Jinqiang L, Yuwen Q, et al. Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway. *Int J Nanomedicine.* 2015. 10: 1-22.
29. Rana K, Verma Y, Rani V, Rana SVS. Renal toxicity of nanoparticles of cadmium sulphide in rat. *Chemosphere.* 2017. 193: 142-50.
30. Fontana L, Leso V, Marinaccio A, Cenacchi G, Papa V, Leopold K, et al. The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats. *Nanotoxicology.* 2014. 9: 843-51.
31. Huang K, Wu C, Huang K, Lin W, Chen C, Guan S, et al. Titanium nanoparticles inhalation induces renal fibrosis in mice via an oxidative stress-up-regulated transforming growth factor- β pathway. *Chem Res Toxicol.* 2014. 28: 354-64.
32. Abass MA, Selim SA, Selim AO, El-Shal A, Gouda ZA. Effect of Orally Administered Zinc Oxide Nanoparticles on Albino Rat Thymus and Spleen. *IUBMB Life.* 2017. 69: 528-39.
33. Sheng L, Wang L, Sang X, Zhao X, Hong J, Cheng S, et al. Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: A biological pathway explored using microarray technology. *J Hazard Mater.* 2014. 278: 180-88.
34. Jia'en Li J, Muralikrishnan S, Ng C, Yung LL, Bay B. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med.* 2010: 235: 25-33.
35. Mebius RE, Kraal G. Structure and Function of the Spleen. *Nature.* 2005. 5: 606-16.
36. Hagens WI, Hagens WI, Oomen AG, Jong WH, Cassee FR, Sips JAM. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007. 49: 217-29.
37. Li M, Zou P, Tyner K, Lee S. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles. *AAPS J.* 2016. 19: 26-42.
38. Lin L, Wong H. Predicting oral drug absorption: Mini review on physiologically-based pharmacokinetic models. *Pharmaceutics.* 2017. 9: 1-41.

39. Mavroudis PD, Hermes HE, Teutonico D, Preuss TG, Schneckener S. Development and validation of a physiology-based model for the prediction of pharmacokinetics/toxicokinetics in rabbits. *PLoS ONE*. 2018. 13: 194-294.
40. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market : challenges and opportunities. *Nanomedicine*. 2018. 14: 93-126.
41. Kapoor M, Lee SL, Tyner KM. Liposomal Drug Product Development and Quality : Current US Experience and Perspective. *AAPS J*. 2017. 19: 632-41.
42. Stone N, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal Amphotericin B (AmBisome): A Review of the Pharmacokinetics , Pharmacodynamics , Clinical Experience and Future Directions. *Drugs*. 2016. 76: 485-500.
43. Nath P, Basher A, Harada M, Sarkar S, Selim S, Maude RJ, et al. Immediate hypersensitivity reaction following liposomal amphotericin-B (AmBisome) infusion. *Tropical Doctor*. 2014. 44: 241-42.
44. Dayem AA, Lee SB, Cho S. The Impact of Metallic Nanoparticles on Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Nanomaterials*. 2018. 8: 1-32.
45. Shah A, Mankus CI, Vermilya AM, Soheilian F, Clogston JD, Dobrovol'skaia MA. Feraheme supresses immune function of human T lymphocytes through mitochondrial damage and mitoROS production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018. 350: 52-63.
46. Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015. 12: 1-15.
47. Defrates K, Markiewicz T, Gallo P, Rack A, Weyhmler A, Jarmusik B, et al. Protein Polymer-Based Nanoparticles : Fabrication and Medical Applications. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 1-20.
48. Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2017. 36: 72-77.
49. Wang B, Wang S, Zhang Q, Deng Y, Li X, Peng L, et al. Recent advances in polymer-based drug delivery systems for local anesthetics. *Acta Biomater*. 2019. 91: 1-30.
50. Kasi PM, Patnaik MM, Peethambaram PP. Case Report Safety of Pegfilgrastim (Neulasta) in Patients with Sickle Cell Trait/Anemia. *Case Rep Hematol*. 2013. 1-4.
51. Misra H, Berryman J, Jubin R, Abuchowski A. A Phase I study to determine safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ANF-RHOTM, a novel PEGylated granulocyte colony-stimulating factor, in healthy volunteers. *Invest New Drugs*. 2017. 36: 75-84.
52. Romeo C, Li Q, Copeland L. Severe pegfilgrastim-induced bone pain completely alleviated with loratadine: A case report. *J Oncol Pharm Pract*. 2014. 21: 301-04.
53. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm*. 2017. 532: 249-68.
54. Gupta R, Shea J, Scafe C, Shurlygina A, Rapoport N. Polymeric Micelles and nanoemulsions as drug carriers: Therapeutic efficacy, toxicity, and drug

resistance. *J Control Release*. 2015. 212: 70-77.

55. Kawaguchi T, Honda T, Nishihara M, Yamamoto T, Yokoyama M. Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats. *J Control Release*. 2009. 136: 240-46.

56. Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers : their lights and shadows. *J Drug Target*. 2014. 7: 576-83.

57. Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, Moretton M, Chiappetta DA. Paclitaxel : What has been done and the challenges remain ahead. *Int J Pharm*. 2017. 526: 474-95.