

Juliana Palermo Tobler

**Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos
oncológicos à base de nanotecnologia.**

Rio de Janeiro

2014

Juliana Palermo Tobler

**Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos oncológicos
à base de nanotecnologia.**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ.

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues

Rio de Janeiro

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

T628b

Tobler, Juliana Palermo

Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos oncológicos à base de nanotecnologia / Juliana Palermo Tobler. - Rio de Janeiro, 2014.

xvi, 126f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Co-orientadora: Profª Drª : Sandra Aurora Chaves Perez Rodrigues

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2014.

Bibliografia: f. 101-126

1. Nanomedicina. 2. Segurança 3. Toxicologia. 4. Regulamentação.
5. ANVISA. I. Título.

CDD 615.1

Juliana Palermo Tobler

**Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos oncológicos
à base de nanotecnologia.**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ.

Aprovada em 28 de 08 de 2014.

Banca Examinadora:



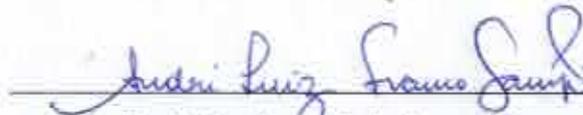
Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha - Presidente da banca (orientador)
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ



Prof. Dr. Jorge Carlos Santos da Costa
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde – FIOCRUZ



Prof.^a Dr.^a Isabella Fernandes Delgado
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ



Prof. Dr. André Luiz Franco Sampaio
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Assaf e Cristina, a minha avó, Jovem, aos meus irmãos e cunhado, Daniel, Camila, Diogo e Leandro, pela amizade e apoio em todos os momentos da minha vida, tanto nos entendimentos quanto nos desentendimentos – família igual não existe!

Aos amigos que encontrei na nossa sensacional turma de mestrado! Nos apoiamos, incentivamos, ajudamos, sempre juntos – todos por um e, um por todos! Amigos de coração. Agradeço em especial a Luciana, Ester, Aline, Marcus e Bruno, cada um do seu jeito me fez ter força e inspiração para concluir esse trabalho.

Aos meus orientadores, Helvécio e Sandra, por todo apoio, confiança e compreensão dedicada nos momentos necessários.

Aos meus queridos amigos, Daniel Negrini, Ester Doca, Flavia Ejzykowicz, Michelle Azevedo, Vanessa Silveira e Daniela Osório pelo carinho de sempre nos momentos de angústia e desespero. Vocês moram no meu coração!

Aos colegas da GSK, pelo suporte, incentivo, pelo ombro amigo e compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores do mestrado, cada um de sua forma, inspirou e incentivou nosso crescimento profissional.

Às secretárias das coordenações de ensino de Farmanguinhos e INCQS, Ariane, Beth e Gorete, por todo suporte e atenção durante o curso! Sempre bem dispostas e solidárias para ajudar cada um dos alunos nas suas diferentes necessidades.

A GSK pelo incentivo e apoio para a realização do mestrado.

Muito obrigada de coração!

Estamos no início do tempo para a raça humana.
Não é irracional que tenhamos que lidar com problemas.
Mas há dezenas de milhares de anos no futuro.
Nossa responsabilidade é fazer o que pudermos,
aprender o que pudermos, melhorar as
soluções, e passá-las adiante.

Richard Feynman

(Tradução livre)

RESUMO

TOBLER, Juliana Palermo. *Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos oncológicos à base de nanotecnologia*. 143f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

A nanotecnologia é uma tecnologia transdisciplinar que está sendo desenvolvida e aplicada em diversas áreas, dentre as quais cabe ressaltar a da saúde, principalmente no que tange à terapêutica e ao diagnóstico. Na oncologia os tratamentos são muito prolongados, a necessidade de exames de imagem é frequente, as doses administradas dos tratamentos são muito elevadas e a toxicidade para o paciente é, muitas vezes, o fator limitante da terapia. Com os avanços da nanotecnologia, espera-se que essas deficiências sejam resolvidas ou, pelo menos, amenizadas, tendo em vista algumas características especiais destes materiais. Entretanto, ainda não se tem clara a relação entre essas características e seus efeitos toxicológicos. Por isso, é necessário entender se os requisitos regulatórios, em termos de avaliação toxicológica, para registro de um medicamento com base em nanotecnologia, são capazes de identificar os possíveis riscos advindos desta nova tecnologia. Esse trabalho teve por objetivo comparar a abordagem regulatória da EMA, FDA e ANVISA com relação à avaliação de nanomedicamentos em comparação com medicamentos convencionais. Para isso, foi analisado o perfil toxicológico do DOXIL[®] em relação a doxorubicina convencional. Esse medicamento foi escolhido para ser analisado por ser o primeiro lipossoma aprovado pelo FDA, em 1995, e pela importância da doxorubicina no tratamento oncológico. Foram analisadas as possíveis deficiências dos testes requeridos pelas agências reguladoras e quando possível foi sugerido procedimentos para sua melhoria. Ainda nesse sentido, foi destacada a importância do compartilhamento de experiência sobre a regulamentação da nanomedicina entre os países e, mais especificamente, seu potencial para impulsionar o desenvolvimento dessa área no Brasil. Pode-se concluir que os testes toxicológicos preconizados atualmente pelas agências reguladoras dos Estados Unidos da América, União Europeia e no Brasil, apesar de estarem alinhados, não são específicos para a avaliação de nanomedicamentos. Em base às informações disponíveis, não se pode garantir que os dados gerados pela bateria de testes solicitada sejam confiáveis para o estabelecimento de uma relação risco/benefício robusta para os nanomedicamentos. Além disso, foram demonstradas muitas das limitações desses testes e algumas sugestões de melhorias para a condução dos mesmos. Ainda nesse sentido, foi ressaltada a importância da caracterização bio-físico-química de cada nanomedicamento submetido às análises. Com relação à bateria de testes toxicológicos solicitada para a avaliação do DOXIL[®], pode-se concluir que seu perfil de segurança não pode ser adequadamente estabelecido pelos testes realizados. Entretanto, os dados de pós-comercialização demonstraram que seu perfil de toxicidade está bem estabelecido e que manteve alinhamento com os resultados obtidos durante o seu desenvolvimento. Não se pode, entretanto, extrapolar este mesmo comportamento para outros casos, os quais deverão seguir normativas atualizadas. À luz dessas diferenças e limitações, este estudo traz à discussão os esforços para entender melhor a aplicabilidade dos requisitos atuais de avaliação toxicológica para aprovação de nanomedicamentos e visa contribuir com a ANVISA para a implementação de um programa de avaliação toxicológica robusto para garantir o desenvolvimento seguro da nanomedicina.

Palavras-chave: Nanomedicina. Segurança. Toxicologia. Regulamentação. ANVISA.

ABSTRACT

Regulatory basis for the safety assessment of nanotechnology-based cancer drugs.

Nanotechnology is a transdisciplinary technology which is under development and is being applied in various fields, among those it is worth highlighted in health, especially with regard to the therapy and diagnosis. Oncologic treatments are very long and expensive, the need for imaging studies is frequent, treatment doses are very high and toxicity is often the limiting therapy factor for patients. The advances in nanotechnology bring a promise expectation to overcome these deficiencies and even mitigate it, taking into consideration some particular characteristics of these materials. However, there is still no clear relationship between these characteristics and their toxicological effects and more studies on this field need to be done in order to validate this as an efficient therapy alternative for those patients. Therefore, it is necessary to understand if the current regulatory requirements in terms of toxicological assessment for registration of a drug based on nanotechnology are able to identify the possible risks arising from this new technology. This study aimed to compare the regulatory approach of the EMA, FDA and ANVISA regarding the evaluation of nanodrugs compared with conventional medicines. For this, the toxicological profile of DOXIL[®] compared to conventional doxorubicin were reviewed. This product was chosen to be analyzed by being the first liposome approved by FDA in 1995, and the importance of doxorubicin in cancer treatment. Possible shortcomings of the tests required by regulatory agencies and possible suggested procedures for improvement were analyzed. Also in this sense, was highlighted the importance of sharing experience on nanomedicine regulation across countries, and more specifically, its potential to boost the development of this area in Brazil. It was concluded that toxicological tests currently recommended by regulatory agencies in the United States, European Union and Brazil, although they are aligned, are not specific to the assessment of nanodrugs. Based on the available information, it cannot guarantee the reliability of the data generated through the battery of tests required for establishing a robust risk / benefit ratio for nanodrugs. Moreover, were demonstrated many of the limitations of these tests and some suggestions for improvement on the conduction of such investigations. Also in this sense, was highlighted the importance of biophysicochemical characterization of each nanomedicine subjected to analysis. It could be concluded that the DOXIL[®] safety profile were not adequately represented by the toxicological tests performed for regulatory approval. However, the post-marketing data sustain that its toxicity profile is well established and maintained in alignment with the results obtained during its development. Notwithstanding, it is not possible to extrapolate the same behavior for other cases, which should follow new standards. In light of these discrepancies and limitations, this study brings to discussion the efforts to understand better the applicability of current toxicological assessment requirements for nanomedicines approval and aims to contribute with ANVISA to implement a robust toxicological assessment program to guarantee the safe development of nanomedicine.

Keywords: Nanomedicine. Safety. Toxicology. Regulation. ANVISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Comparativo entre o tamanho dos nanomateriais e outras estruturas.....	06
Figura 2:	Estimativa de Novos Casos por Tipo de Câncer no Brasil.....	13
Figura 3:	Patogenia do Câncer.....	14
Figura 4:	Desenvolvimento e aprovação de alguns produtos nanotecnológicos.....	19
Figura 5:	Formação da Corona Proteica.....	28
Figura 6:	Representação da estrutura tridimensional do microambiente tumoral.....	63
Figura 7:	Fórmula Estrutural da Doxorubicina (C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁).....	75
Figura 8:	Esquema da estrutura do DOXIL [®]	81
Figura 9:	Fórmulas estruturais do MPEG-DSPE e HSPC.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Métodos Comuns para Avaliação de Nanomateriais.....	08
Tabela 2:	Mapeamento dos processos e atividades voltadas para nanotecnologia nas agências reguladoras.....	47
Tabela 3:	Diretrizes da OCDE para teste de produtos químicos.....	56
Tabela 4:	Possíveis interferências entre os nanomateriais e os testes toxicológicos.....	64
Tabela 5	Resultado da avaliação de diferentes tipos de nanoestruturas nos ensaios de genotoxicidade.....	69
Tabela 6	Alteração dos parâmetros farmacocinéticos da doxorubicina entre DOXIL [®] e Doxorubicina Livre em modelos animais.....	82
Tabela 7	Comparação indireta dos parâmetros farmacocinéticos para PLD-1, DOXIL [®] e Doxorubicina convencional (DOX Livre) em pacientes com tumores sólidos.....	87
Tabela 8	Estudos de fase II e III com DOXIL [®]	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Bases de dados utilizadas para o levantamento bibliográfico.....	45
Quadro 2:	Organizações Governamentais e Intergovernamentais.....	46
Quadro 3:	Termos primários e secundários utilizados para o levantamento bibliográfico.....	46
Quadro 4:	Projetos de Lei Submetidos por deputados e senadores sobre nanotecnologia.....	50
Quadro 5:	Guias ICH relacionados com avaliação toxicológica para medicamentos.....	54
Quadro 6:	Toxicidade comparativa da doxorubicina convencional e lipossomal.....	92
Quadro 7	Número de observações toxicológicas para doxorubicina lipossomal.....	94
Quadro 8	Número de observações toxicológicas para doxorubicina convencional.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	- Bidimensional
3D	- Tridimensional
AAS	- Espectroscopia de Absorção Atômica (do Inglês, <i>Atomic absorption spectroscopy</i>)
ABV	Combinação de doxorubicina, bleomicina e vincristina.
ADN	- Ácido desoxirribonucleico (ADN, em Português: ácido desoxirribonucleico; ou DNA, em Inglês: deoxyribonucleic acid)
AFM	- Microscopia de Força Atômica (do Inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AgNps	- Nanopartículas de prata
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	- Ácido ribonucleico (sigla em Português: ARN e em Inglês: RNA, ribonucleic acid)
BET	- Método de Adsorção de Nitrogênio/Hélio (do Inglês, Brunauer, Emmett and Teller method)
BV	Combinação de bleomicina e vincristina.
CARPA	Reações de hipersensibilidade conhecidas como reações pseudoalérgicas
CBPF	- Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CETENE	- Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CHDF	- Fracionamento Hidrodinâmico por Capilaridade (do Inglês, <i>Capillary Hydrodynamic Fractionation</i>)
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CtB	- Citocalasina B
DCF	- Teste de diclorofluoresceína (do Inglês, <i>dichlorofluorescein assay</i>)
DLS	- Espalhamento dinâmico de luz (do Inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMA	- (1) <i>Differential mobility analyzer</i> / (2) <i>Dynamic mechanical analysis</i>
DSC	- <i>Differential scanning calorimetry</i>
ECHA	- Agência de Substâncias Químicas Europeia (do Inglês, <i>European Chemicals Agency</i>)
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMA	- Agência Regulatória Europeia (<i>European Medicines Agency</i>)
ESA	- Espectroscopia Eletroacústica (do Inglês, <i>Electroacoustic Spectroscopy</i>)
EUA	- Estados Unidos da América

FDA	- Agência Regulatória dos EUA (Food and Drug Administration)
FFDCA	- United States Federal Food, Drug, and Cosmetic Act
FFF	- Fracionamento por Campo e Fluxo (do Inglês, Field Flow Fractionation)
FTIR	- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do Inglês, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GE	- Eletroforese em Gel (do Inglês, Gel electrophoresis)
GPC	- Cromatografia por Permeação em Gel (do Inglês, Gel Permeation chromatography)
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do Inglês, High performance liquid chromatography)
HPRT	- Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRTEM	- Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (do Inglês, High Resolution Transmission Electron Microscopy)
IARC	- International Agency for Research on Cancer
ICH	- Conferência Internacional de Harmonização (do Inglês, International Conference on Harmonisation)
ICP-MS	- Espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (do Inglês, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy)
Il-8	- Interleucina 8
INCA	- Instituto Nacional do Câncer (do Brasil)
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	- International Standardization Organization
ITC	- Calorimetria de Titulação Isotérmica (do Inglês, Isothermal Titration Calorimetry)
ITF	- Innovation Task Force
ITT	- Intention-to-treat
LDE	- Laser doppler electrophoresis
LDH	- Enzima lactato-desidrogenase
LNLS	- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MCTI	- Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação
ME	- Matriz Extracelular
MPEG	- Metoxipolietilenoglicol
MS	- Espectroscopia de Massa (do Inglês, Mass spectrometry)
MSV	- Multistage vector

MTT	- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCI	- National Cancer Institute (EUA)
NM	- Nanomaterial
NMR	- Ressonância Magnética Nuclear (do Inglês, Nuclear Magnetic Resonance)
NN	- Nanotecnologia
NNI	- Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (do Inglês, National Nanotechnology Initiative)
NP	- Nanopartícula
OCDE	- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PALS	- Dispersão da Luz com Análise de Fases (do Inglês, Phase Analysis Light Scattering)
PEG	- Polietilenoglicol
pH	- Potencial hidrogeniônico
PPA	- Plano Plurianual
REACH	- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RNAi	- Ácido ribonucleico de interferência (sigla em Português: ARNi e em Inglês: RNAi, interference ribonucleic acid)
SEM	- Microscópio Eletrônico de Varredura (do Inglês, Scanning Electron Microscope)
SLS	- Espalhamento de Luz Estático (do Inglês, Static light scattering)
SMA	- Analisador de Tamanho de Partículas por Mobilidade Elétrica (do Inglês, Scanning mobility particle sizer)
SPM	- Microscopia de varredura por sonda (do Inglês, Surface Probe Microscopy)
TEM	- Microscopia Eletrônica de Transmissão (do Inglês, Transmission Electron Microscopy)
TGA	- Análise Termogravimétrica (do Inglês, Thermal Gravimetric Analysis)
TiO ₂	- Dióxido de Titânio
TK	- Timidina Quinase (do Inglês, Thymidine kinase)
UE	- União Europeia
UV-Vis	- Espectrofotometria UV-Vis (do Inglês, Ultraviolet–Visible Spectrophotometry)
WPMN	- Working Party on Manufactured NMs
XDC	- X-ray disk centrifuge

- XPRT - Xantina-guanina-fosforribosil-transferase
- XPS - X-ray Photoelectron Spectroscopy
- XRD - X-ray Diffraction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Nanotecnologia.....	3
2.2 Aplicações da nanotecnologia na medicina	9
2.3 Aplicação da nanomedicina em oncologia.....	12
2.4 Nanotoxicologia.....	22
2.5 Panorama da nanotecnologia nos processos regulatórios dos Estados Unidos, Europa e Brasil.....	33
3. OBJETIVO	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4. METODOLOGIA.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Análise do posicionamento das agências reguladoras em relação à necessidade de regulamentação específica para nanomedicamentos	48
5.2 Guias para a avaliação toxicológica dos nanomedicamentos	53
5.3 Revisão dos testes toxicológicos requeridos pelas agências regulatórias e sua aplicabilidade e limitações para a avaliação dos nanomedicamentos	55
5.4 Padronização da terminologia utilizada para nanotecnologia	71
5.5 Base de dados disponíveis sobre produtos nanotecnológicos	73
5.6 Revisão da aprovação de um produto nanotecnológico: DOXIL®	74
5.7 Discussão geral e sugestões para incremento da regulamentação do setor.....	96

6. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia (NN) é uma ciência transdisciplinar, que está sendo desenvolvida e aplicada em diversas áreas, tais como: automotiva, têxtil, de materiais esportivos, telecomunicações, eletrônica, alimentos, beleza, dispositivos médicos, testes diagnósticos, farmacêutica, dentre outras (LAUTERWASSER, 2005; BOWMAN; HODGE, 2006; ABDI, 2010). Até 2011 já estavam no mercado mais de 1.300 produtos com base em nanotecnologia, de acordo com o inventário de *The Project on Emerging Nanotechnologies* (CONSUMER PRODUCTS INVENTORY, 2013). Além desses, existem muitos outros produtos em diferentes fases de desenvolvimento.

Dentre essas áreas, cabe ressaltar a importância da nanotecnologia para a área da saúde, principalmente no que tange à terapêutica e ao diagnóstico (MURDAY *et al.*, 2009), já que é notória a necessidade de sistemas terapêuticos e de diagnósticos mais eficientes, principalmente quanto à relação risco/benefício para os pacientes (SHI, 2011).

Nesse sentido, uma das áreas nas quais existe maior exposição à toxicidade dos tratamentos e agentes diagnósticos tradicionais é a oncologia. Nesta área, os tratamentos são muito prolongados, a necessidade de exames de imagem é frequente e as doses administradas dos tratamentos são muito elevadas. Além disso, é comum a utilização de terapias combinadas, pois existem muitos mecanismos de resistência às terapias convencionais onde os fármacos são distribuídos de forma não específica no organismo (FERRARI, 2005; DAVIS *et al.*, 2008; HALEY; FRENKEL, 2008).

Ressalta-se, ainda, que existem muitos tipos diferentes de câncer e para cada um existem distintos fatores prognósticos ou marcadores biológicos, os quais conferem peculiaridade aos pacientes, ainda que portem o mesmo tipo de câncer. Essas peculiaridades interferem na efetividade e na tolerabilidade dos tratamentos (DEROSE *et al.*, 2011; MENDELSON, 2013; LIU *et al.*, 2014).

Isto posto, a despeito das melhorias na eficiência dos tratamentos convencionais ao longo dos últimos anos, a maioria dessas formulações estão associadas a vários desfechos e sintomas negativos para o paciente, como: toxicidade sistêmica, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade vascular, infertilidade, complicações tromboembólicas, perda de cabelo, náuseas, vômito, infarto do miocárdio, dentre outras. Além das dificuldades em termos de administração e aderência dos pacientes aos tratamentos (MADANI *et al.*, 2011).

Com os avanços da nanotecnologia, espera-se que essas deficiências sejam resolvidas ou, pelo menos, amenizadas, tendo em vista algumas características dos nanomateriais, tais como: elevada razão superfície/volume (maior carregamento de princípio ativo), forma e tamanho (facilitando a captação pela célula alvo - efeito da permeabilidade e retenção aumentadas - EPR), introdução de moléculas direcionadoras e melhorias físico-químicas do nanossistema (tempo de circulação sanguínea aumentado, evasão do sistema retículo-endotelial, direcionamento eficaz e acúmulo nos locais de destino) (MAEDA *et al.*, 2000; JAIN; STYLIANOPOULOS, 2010; DOANE; BURDA, 2012).

Grande parte desses benefícios ainda não está traduzida em medicamentos comercialmente disponíveis no mercado. Para o tratamento do câncer podemos citar: o Doxil/Caelyx^{®1}, Abraxane[®], Myocet[®] e Daunoxome[®] (HUYNH *et al.*, 2009; DESAI, 2012; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; SVENSON, 2014). Neste caminho árduo da ciência em busca de nanomedicamentos e nanodispositivos, deve-se levar em consideração, de forma não menos importante, a adequada caracterização do perfil de toxicidade inerente a esses novos materiais. Apesar de algumas publicações mostrarem efeitos toxicológicos das nanopartículas nas células, a natureza desta citotoxicidade ainda não está esclarecida (ELSAESSER; HOWARD, 2012).

De fato, a população já está exposta aos efeitos benéficos e aos potenciais riscos dessa nova tecnologia. Sendo assim, é importante entender e caracterizar esses materiais adequadamente, bem como compilar e disponibilizar essa informação para a comunidade científica, a indústria, os órgãos reguladores e para a sociedade como um todo.

A justificativa para a escolha deste tema dá-se pela importância da toxicidade dos nanomateriais para os pacientes. Por isso, é necessário entender se os requisitos regulatórios, em termos de avaliação toxicológica, para registro de um medicamento com base em NN, são capazes de identificar os possíveis riscos advindos desta nova tecnologia.

¹ DOXIL[®] e Caelyx[®] são os dois nomes comerciais da doxorubicina lipossomal peguilada da Schering-Plough, sendo DOXIL[®] o nome registrado nos Estados Unidos e Caelyx[®] na Europa e no Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

Inicialmente, importa destacar algumas considerações que terão por finalidade elucidar pontos essenciais e situar o leitor no contexto do conteúdo a ser analisado. Destaca-se, para tanto, que a palestra do pesquisador Richard P. Feynman em 29 de dezembro de 1959 é considerada como marco inicial da concepção da ideia da NN, mesmo sem que este tenha utilizado diretamente o termo nanotecnologia (FEYNMAN, 1960).

Durante seu discurso, o referido pesquisador procurou incitar a possibilidade de existir um fenômeno complexo que teria uma infinidade de aplicações. Esse fenômeno seria a capacidade de manipular e controlar materiais em uma escala extremamente pequena. Além disso, nessa escala incrivelmente minúscula, existiria tanto espaço que viabilizaria um mundo de possibilidades, como, por exemplo, escrever toda a enciclopédia britânica na cabeça de um alfinete ou, mais ainda, escrever todo o conteúdo de todos os livros do mundo em um pedaço de papel não maior ou mais pesado que uma carta normal (FEYNMAN, 1960).

Já em 1974, o pesquisador japonês Norio Taniguchi utilizou diretamente o termo nanotecnologia quando descrevia um processo de semicondutores. Esta foi considerada a primeira utilização deste termo (TANIGUCHI, 1974).

A partir da década de 80, a convergência de descobertas científicas possibilitou um considerável avanço da nanotecnologia. Dentre esses avanços, pode-se citar o desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento, em 1981, que possibilitou a visualização de superfícies em nível atômico (BINNIG; ROHRER, 1987a; 1987b).

Outro marco importante que levou ao aumento da popularização da nanotecnologia foi a publicação do livro *Engines of creation: The coming era of nanotechnology*, do pesquisador Eric Drexler, em 1986. A nanotecnologia, a partir da visão do professor Drexler, também ficou conhecida como Nanotecnologia Molecular (DREXLER, 1986).

Desta forma, as nanopartículas (NPs) tornaram-se uma ferramenta importante para muitas indústrias, incluindo a farmacêutica, sendo que, ao longo das últimas duas décadas, vários produtos com base em NN de primeira geração entraram no mercado (SHI *et al.*, 2011).

Com o início da evolução dos conceitos e a manipulação da matéria, pôde-se notar que seria necessária uma abordagem transdisciplinar para que todas as facetas dessa nova tecnologia pudessem ser estudadas, compreendidas e aplicadas (HADORN, 2008).

Quanto mais conhecimento é gerado nessa área, maior é a complexidade para solucionar os desafios insurgentes. Observa-se que as áreas envolvidas não podem ser simplesmente separadas e linearmente analisadas para se encontrar soluções únicas, como preconiza a metodologia cartesiana. Nesse pequeno e vasto mundo da nanotecnologia, estão entremeados conceitos e problemáticas de diversas ciências - biológicas, exatas, sociais e humanas.

Desse universo de discussões sobre nanotecnologia, surge a necessidade de uniformizar os conceitos utilizados. Essa padronização é necessária para que o conhecimento gerado possa ser analisado, comparado, compilado e utilizado por diversos pesquisadores, órgãos regulamentadores, indústrias e membros da sociedade em geral, entre outros.

2.1.1 Definição

Entre as diferentes agências regulatórias e os centros de pesquisa existem divergências quanto à definição do que seria nanotecnologia (LÖVESTAM *et al.*, 2010). Para efeito deste trabalho, a nanotecnologia é o entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros, em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos dependentes do tamanho normalmente permite novas aplicações do material. Essa é a conceituação utilizada pela Organização Internacional de Padronização (ISO), bem como para propósitos regulatórios na União Europeia (ISO, 2010).

Vale citar que, nos Estados Unidos da América, a *Food and Drug Administration* (FDA) - agência regulatória americana - apesar de ainda não ter uma definição formal estabelecida para materiais/produtos nanotecnológicos, os considera como produtos formados por partículas que tenham pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm, ou produtos que demonstrem propriedades ou fenômenos, incluindo propriedades físico-químicas ou efeitos biológicos, que sejam atribuídos à sua dimensão, mesmo que esteja fora da dimensão anteriormente mencionada (FDA, 2012).

Neste contexto, é importante mencionar que ainda existem muitas discussões em curso sobre o que deveria ser considerado para a definição de material/produto nanotecnológico: tamanho, forma, carga, relação superfície-volume e outras propriedades físico-químicas da partícula formadora do material.

Dentre as possíveis definições, importa ressaltar uma que vem sendo empregada cada vez mais nas publicações científicas: nanomaterial é definido como qualquer material fabricado intencionalmente, contendo partículas em estado desagregado, agregado ou aglomerado - onde pelo menos 50% das partículas na distribuição quantidade/tamanho possui uma ou mais dimensões externas entre 1 e 100 nm. Quando pautado por preocupações para com o meio ambiente, a saúde, a segurança ou a competitividade, o limiar da distribuição quantidade/tamanho pode ser considerado de 1 – 50% (UE, 2013).

Além disso, fulerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono com parede única de carbono com uma ou mais dimensões abaixo de 1 nm devem ser considerados nanomateriais. Onde seja tecnicamente factível e solicitada por regulamentação específica, a aderência a esta definição pode ser determinada pela relação superfície/volume. Um material pode ser considerado nanomaterial desde que a relação superfície/volume específica do material seja maior que $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ (UE, 2013).

Entretanto, materiais que estejam incluídos na definição original e possuam relação superfície/volume menor que $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ seguem sendo considerados nanomateriais - Essa definição é recomendada por um relatório recentemente publicado pela União Europeia (*Nanosafety – Risk Governance of Manufactured Nanoparticles*) (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012), que teve como foco principal definir alguns termos para finalidades regulatórias, sendo certo que já se encontra prevista a revisão dessa definição para 2014.

Dentre outros motivos para a limitação da nanoescala entre 1 e 100 nm, está a preocupação em realmente restringir os produtos que necessitam ser submetidos à análise regulatória diferenciada e que esse critério seja o mais claro possível, tanto para as indústrias, quanto para as agências regulatórias. Essa definição não tem a intenção de identificar quais materiais são perigosos ou não (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012).

Como forma de ilustrar a magnitude da escala nano, segue abaixo figura comparativa entre estruturas nanométricas e macroscópicas (figura 1).

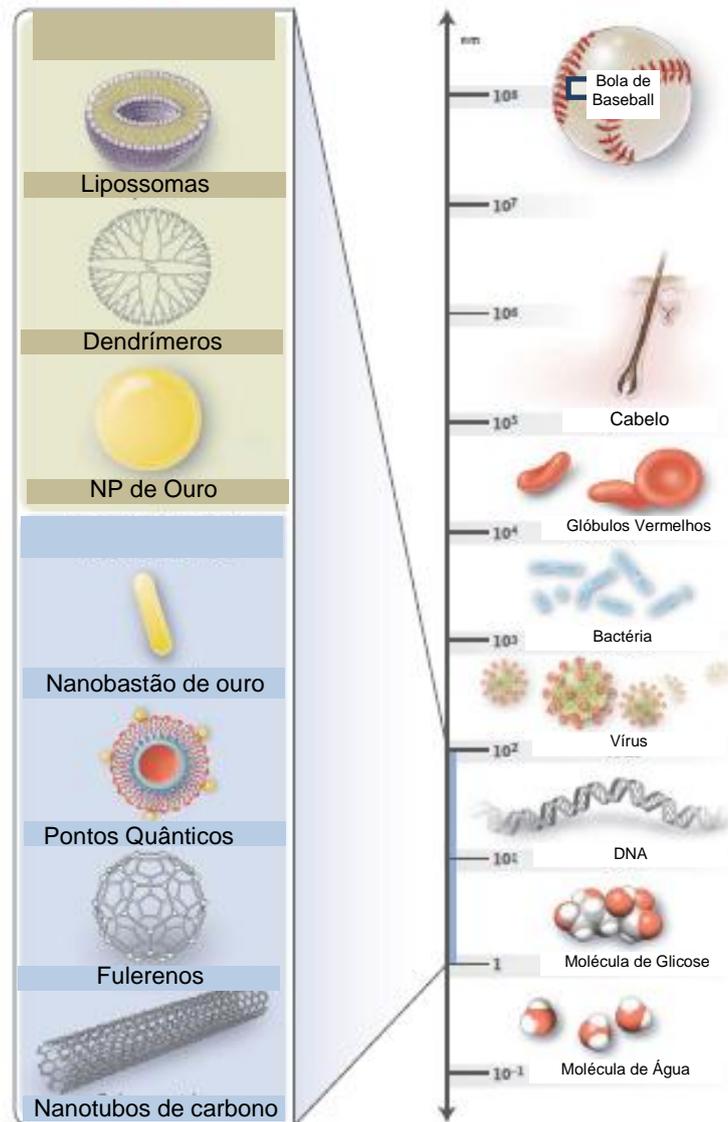


Figura 1: Comparativo entre o tamanho dos nanomateriais e outras estruturas. Fonte: KIM; RUTKA; CHAN, 2010.

2.1.2 Técnicas de estruturação de nanomateriais

Há uma grande variedade de técnicas para a estruturação de nanomateriais, dentre as quais existe variabilidade quanto à qualidade do produto fabricado, à velocidade e ao custo de fabricação. Essas técnicas de fabricação são divididas em duas categorias: 'bottom-up' e 'top-down' (SOCIETY, 2004).

A fabricação 'bottom-up' se baseia na construção de estruturas, átomo por átomo ou molécula por molécula. Essa técnica pode ser dividida em três categorias: síntese química,

automontagem e montagem posicional. Somente nessa última categoria os átomos ou moléculas podem ser colocados deliberadamente um-a-um. Nas outras categorias um grande número de átomos, moléculas ou partículas são utilizados ou criados por síntese química e, em seguida, se organizam de forma natural em estruturas específicas (SOCIETY, 2004).

Na fabricação ‘top-down’, isto é, de cima para baixo, parte-se do material macroscópico, por procedimentos de decapagem, moagem ou por remoção de material excedente, o que pode ser feito por meio de diferentes técnicas, tais como engenharia de precisão e litografia (SOCIETY, 2004; CANELAS; HERLIHY; DESIMONE, 2009).

2.1.3 Métodos de caracterização dos nanomateriais

A caracterização adequada de qualquer material é de extrema importância para sua correta classificação (WARHEIT, 2008). Os critérios de classificação podem variar de acordo com o tipo de material analisado, mas, infelizmente, nem sempre esses critérios estão definidos para todos os casos. Dentre esses casos, incluem-se os nanomateriais. Diante desse contexto, observa-se a necessidade de se avaliar, primeiramente, quais são os reais requisitos a serem caracterizados, de forma que possam ser amplamente aceitos e incorporados à prática de todos os profissionais que trabalham com nanotecnologia (CRIST *et al.*, 2013).

No caso dos nanomateriais, não é importante apenas o tamanho, mas também a existência de determinadas propriedades (ópticas, magnéticas, mecânicas, catalíticas, elétricas etc.) que, de alguma forma, estão relacionadas com outras peculiaridades do material em análise, conferindo-lhe função adicional. Nesse caso, por tratar-se de características ainda não completamente compreendidas, faz-se necessário caracterizar, de forma válida, precisa e fidedigna, o conjunto de peculiaridades conferidas a este material (POWERS *et al.*, 2007; WARHEIT, 2008; BERHANU, 2009; LANDSIEDEL *et al.*, 2009; SAYES; WARHEIT, 2009; JORIS, 2013).

Somente assim será possível planejar de forma racional a bateria de testes a que esses nanomateriais deveriam ser submetidos, para serem utilizados como nanomedicamentos, por exemplo, assim como para enriquecer a análise e discussão de possíveis resultados obtidos desses testes, pois, como se sabe, boa parte das dúvidas em relação às questões toxicológicas geradas atualmente, repousa na ainda inconclusiva caracterização de alguns materiais

(POWERS *et al.*, 2007; WARHEIT, 2008; BERHANU, 2009; LANDSIEDEL *et al.*, 2009; SAYES; WARHEIT, 2009; JORIS, 2013).

Uma variedade de técnicas tem sido desenvolvida ou adaptada para a caracterização de nanomateriais, incluindo microscopia, espectroscopia, espectrometria, técnicas cromatográficas etc. É importante notar que as diferentes técnicas adequar-se-ão às diferentes apresentações do material em análise (por exemplo, aerossóis, suspensões etc.) e, em muitos casos, nenhuma técnica isolada será capaz de satisfazer completamente os requisitos para a caracterização de um nanomaterial. Além disso, vale lembrar que o momento e o local de onde é retirada a amostra para caracterização também podem impactar no resultado obtido e, por consequência, impactar na comparabilidade dos dados disponíveis na literatura.

A título de ilustração, sem a intenção de exaurir as opções de técnicas de avaliação, pode-se notar a variabilidade de técnicas de caracterização disponíveis para nanomateriais na Tabela 1, que segue abaixo. Essa tabela foi extraída do guia de procedimento dos Estados Unidos sobre o formato no qual as informações sobre nanomateriais devem ser informados ao órgão regulador para sua avaliação (FDA, 2010).

Tabela 1: Métodos Comuns para Avaliação de Nanomateriais.

Propriedades	Técnicas de avaliação
MORFOLOGIA	
Tamanho (partícula primária)	TEM, SEM, AFM, XRD
Tamanho (agregado/aglomerado)	TEM, SEM, AFM, DLS, FFF, AUC, CHDF, XDC, HPLC, DMA(1)
Distribuição de tamanho	TEM, SEM, AFM, DLS, AUC, FFF, HPLC, SMA
Massa molar	SLS, AUC, GPC
Estrutura/Formato	TEM, SEM, AFM, NMR
Estabilidade (estrutura 3D)	DLS, AUC, FFF, SEM, TEM
SUPERFÍCIE	
Área de superfície	BET
Carga de superfície	SPM, GE, MÉTODOS DE TRITAÇÃO
Potencial Zeta	LDE, ESA, PALS
Composição da superfície da partícula	SPM, XPS, MS, RS, FTIR, NMR
Cobertura da superfície da partícula	AFM, AUC, TGA
Reatividade da superfície	Varia com o nanomaterial
Interação superfície-núcleo	SPM, RS, ITC, AUC, GE
Topologia	SEM, SPM, MS
QUÍMICA	
Composição química (núcleo e superfície)	XPS, MS, AAS, ICP-MS, RS, FTIR, NMR
Pureza	ICP-MS, AAS, AUC, HPLC, DSC
Estabilidade (química)	MS, HPLC, RS, FTIR

Propriedades	Técnicas de avaliação
Solubilidade (química)	Varia com o nanomaterial
Estrutura química	NMR, XRD
Estrutura cristalina	XRD, DSC
Atividade catalítica	Varia com o nanomaterial
OUTRAS	
Preenchimento do nanomaterial com fármaco	MS, HPLC, UV-Vis, varia com o nanomaterial
Potência e funcionalidade do nanossistema	Varia com o nanomaterial
Deteção de liberação do ativo <i>in vitro</i>	UV-Vis, MS, HPLC, varia com o nanomaterial
Deformabilidade	AFM, DMA(2)

Siglas mantidas em Inglês devido à sua ampla utilização. Tradução disponível na lista de siglas.

Fonte: FDA, 2010.

2.2 Aplicações da nanotecnologia na medicina

À aplicação da nanotecnologia na área médica (tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos) dá-se o nome de “nanomedicina”. Os projetos de pesquisa nesta área exploram, principalmente, formas de vetorização de fármacos, sua liberação e ação no local e sistemas diagnósticos mais eficazes e menos invasivos (MURDAY *et al.*, 2009; KIM; RUTKA; CHAN, 2010; WANG; BILLONE; MULLETT, 2013).

Nesse contexto, vale ressaltar a importância das pesquisas na identificação de alvos terapêuticos específicos (célula e receptores), o percurso que o fármaco deve fazer para alcançar seu local de ação e os tipos de interações necessárias para que possa gerar sua resposta biológica para uma condição clínica específica. A partir desse conhecimento, as pesquisas em nanomedicina podem desenvolver-se de forma mais consistente e eficaz, pois, com o desenvolvimento de novas tecnologias em escala nanométrica, pretende-se mudar as bases da prevenção, tratamento e diagnóstico disponíveis atualmente (EUROPEAN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 2005).

Considerando os medicamentos existentes no mercado, pode-se dizer que ainda não dispõem de um sistema muito elaborado de liberação e direcionamento do fármaco, mas, mesmo assim, tem-se demonstrado melhoria dos perfis de tolerabilidade e de eficácia de alguns medicamentos tradicionais (ARORA *et al.*, 2012). Nesse sentido, apesar do seu

enorme potencial, a translação de NPs da bancada para as prateleiras das farmácias tem enfrentado desafios consideráveis (SHI *et al.*, 2011).

Um problema significativo tem sido a dificuldade no desenvolvimento de NPs-alvo, com propriedades bio-físico-químicas ótimas, através de processos de fabricação robustos que facilitem o escalonamento (*scale up*) e a manufatura. Atualmente, os esforços estão centrados no desenvolvimento de NPs através de automontagem por processos de alto rendimento, para facilitar a triagem, o desenvolvimento e a fabricação de NPs com estas propriedades distintas (SHI *et al.*, 2011).

A superação destas dificuldades mostra-se importante, pois, em razão de seu tamanho nano, os nanomedicamentos oferecem vantagens sobre os medicamentos convencionais. De acordo com Parveen e colaboradores (2012), algumas possíveis vantagens em utilizar nanopartículas são:

- 1) Aumentar a solubilidade aquosa do princípio ativo.
- 2) Proteger o princípio ativo da degradação.
- 3) Possibilitar uma liberação prolongada do princípio ativo.
- 4) Melhorar a biodisponibilidade do princípio ativo.
- 5) Melhorar o direcionamento do ativo para o sítio de ação.
- 6) Melhorar o perfil de toxicidade do medicamento.
- 7) Possibilitar o desenvolvimento do medicamento para diversas vias de administração.
- 8) Permitir o desenvolvimento mais rápido de formulações.
- 9) Permitir o diagnóstico mais precoce do câncer e de seus marcadores biológicos.

No estudo de Elbakry e colaboradores (2012) é demonstrado o benefício de se utilizar sistemas nanoparticulados (nanopartículas de ouro - Au) para o transporte e direcionamento de medicamentos. Nesse estudo, é feita a comparação não apenas entre o tamanho da partícula (20, 30, 50 e 80 nm) e sua endocitose na célula de destino, mas também com a quantidade de princípio ativo a ser entregue em cada célula pelo sistema Au-PEI (AuNP-ácido nucleico-polietilenoimina). Como resultado deste estudo, foi demonstrado que o sistema nanoparticulado final de 88 nm (20 nm de Au, 12 nm de cobertura e 56 nm de corona proteica) levou ao maior número de nanopartículas e moléculas terapêuticas de ADN por célula, bem como permitiu maiores concentrações de polietilenoimina, um agente reconhecidamente tóxico.

Ainda nesse sentido, o estudo de Gao e colaboradores (2013) demonstra a utilização de nanopartículas para aprimorar a formulação de princípios ativos pouco solúveis, como é o caso do lapatinibe (inibidor reversível da autofosforilação de ambos os receptores tirosina-quinase HER1 e HER2). Isso porque, através da incorporação do lapatinibe em uma nanopartícula similar a uma lipoproteína (LTNP – corona lipídica e núcleo de lapatinibe e albumina), pode-se demonstrar significativa melhora em sua endocitose na célula de destino, assim como indução de apoptose.

Hoshino e colaboradores (2012) discutem em seu trabalho a possibilidade de se utilizar as nanopartículas como biodetoxificadores (ou antídotos), mas existem muitos desafios para se alcançar uma nanopartícula que tenha alta afinidade e capacidade de carrear essas toxinas. Além disso, deve-se levar em consideração o perfil de toxicidade desta nanopartícula com sua corona proteica, pois, como já se sabe, essas proteínas adsorvidas podem alterar ou suprimir o desempenho esperado. Nesse estudo foi usada a melitina, principal constituinte do veneno da abelha, e foi demonstrado que a administração das nanopartículas, após a exposição à toxina, reduziu a mortalidade dos camundongos.

Entretanto, enquanto nanomedicamentos oferecem benefícios promissores, é preocupante que as propriedades inerentes das nanopartículas, como o seu tamanho, forma, potencial de aglomeração e agregação, e química de superfície, possam afetar adversamente a segurança da sua utilização (HOCK; YING; WAH, 2011).

Além disso, de acordo com Hock e colaboradores (2011) atualmente não há diretrizes regulamentares desenvolvidas especificamente para nanomedicamentos, devido a limitações, incluindo o conhecimento insuficiente sobre o comportamento das nanopartículas, a ausência de nomenclatura padronizada e falta de validação da metodologia para avaliação e caracterização de nanopartículas. E mais, estas limitações, acrescidas à falta de pessoal qualificado, o protocolo de segurança específico e o controle ineficaz de contaminação de nanopartículas, desafiam as atuais exigências das boas práticas de fabricação relativas à produção de nanomedicamentos. Por estas razões, autoridades regulatórias estão buscando melhorar exigências para o controle dos processos de fabricação, qualidade do produto e de segurança dos nanomedicamentos.

Assim, à medida que cresce o conhecimento sobre nanotecnologia, cresce também o número de debates sobre sua importância e seus impactos para a sociedade. Dentre os tópicos discutidos, estão os fatores sociais, éticos e possíveis impactos à saúde dos organismos expostos (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012).

2.3 Aplicação da nanomedicina em oncologia

2.3.1 Epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo

De acordo com os dados do Globocan 2012, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012.

Cerca de 30% das mortes por câncer estão relacionadas aos cinco principais fatores de risco: elevado índice de massa corporal, baixa ingestão de frutas e legumes, sedentarismo, tabagismo e consumo de álcool (WHO, 2014). O tabagismo é o fator de risco mais importante para o câncer, sendo responsável por mais de 20% dos óbitos por câncer globais e cerca de 70% dos óbitos globais por câncer de pulmão (WHO, 2014).

Mais de 60 % do total anual dos casos novos de câncer no mundo ocorrem na África, Ásia e América Central e do Sul. Estas regiões são responsáveis por 70 % das mortes por câncer no mundo (WHO, 2014).

Em 2030, a expectativa global é de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para os anos de 2014 e 2015 mostra a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (~69 mil), mama feminina (~57 mil), cólon e reto (~33 mil), pulmão (~27 mil), estômago (~20 mil) e colo do útero (~15 mil), conforme Figura 2. (INCA, 2014)

Localização primária			casos	%			Localização primária			casos	%
	Próstata	68.800	22,8%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%			
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Cólon e Reto			17.530	6,4%				
Cólon e Reto	15.070	5,0%	Tracheia, Brônquio e Pulmão			10.930	4,0%				
Estômago	12.870	4,3%	Glândula Tireoide			8.050	2,9%				
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Estômago			7.520	2,7%				
Esôfago	8.010	2,6%	Corpo do Útero			5.900	2,2%				
Laringe	6.870	2,3%	Ovário			5.680	2,1%				
Bexiga	6.750	2,2%	Linfoma não Hodgkin			4.850	1,8%				
Leucemias	5.050	1,7%	Leucemias			4.320	1,6%				
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%									

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 2: Estimativa de Novos Casos por Tipo de Câncer no Brasil. Fonte: INCA, 2014.

2.3.2 Patogenia do câncer

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas.

Existem, aproximadamente, 200 tipos diferentes de câncer conhecidos até o momento. Estes se diferenciam por sua capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (MADANI *et al.*, 2011; INCA, 2014).

Em 2000, os pesquisadores Hanahan e Weinberg propuseram o conjunto de seis marcadores essenciais para o entendimento da complexidade das doenças neoplásicas. Basicamente, o conceito dessa publicação fundamentava a origem do câncer como sendo a progressão de células normais que, ao longo do tempo, adquirem características novas. Essas características diferenciam as células novas das células originais, dando a elas a capacidade de se tornarem malignas.

A organização dessas novas células e suas novas habilidades demonstram que o câncer não é somente um aglomerado de células que se proliferam infinitamente, mas sim uma doença complexa, que se desenvolve através do estabelecimento de novos processos e interações que possibilitam sua sobrevivência. Dentre essas interações, destaca-se o papel das células adjacentes às células neoplásicas. Essas células têm participação ativa na formação e manutenção do câncer. Por isso, para se entender realmente a fisiopatologia dessa doença, faz-se necessário entender todo seu microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Em 2011, esses mesmos pesquisadores publicaram uma atualização do artigo mencionado acima. Nessa atualização foram incluídos mais detalhes sobre cada marcador e

novos marcadores e características, à luz do conhecimento científico gerado na década que se sucedeu (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre esses marcadores fundamentais estão: a autossuficiência em sinais de crescimento, a dessensibilização aos fatores antiproliferativos, a habilitação da invasão tissular e a formação de metástases, a capacidade replicativa ilimitada e a ativação da angiogênese. Em 2011 foram adicionados: a desregulação energética da célula, a promoção da inflamação pelas células cancerígenas, a habilidade de se proteger do sistema imunológico e a instabilidade genômica e estímulo a mutações, como mostrado na Figura 3 (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



Figura 3: Patogenia do Câncer. Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Deve-se estudar e entender todas essas características como fatos conjuntos e não isolados. Todos esses processos ocorrem em paralelo na célula cancerígena, sempre que necessário. Seria como se a célula neoplásica fosse um tanque de guerra de última geração, onde tudo que fosse necessário para cumprir sua função fosse acionado por diversos botões do seu painel de comando e, além disso, esse tanque fosse aprendendo novas funções de acordo com as necessidades. Abaixo estão mais detalhes de cada uma dessas características citadas anteriormente.

Dentre os processos mais importantes para serem adaptados na célula cancerígena está o controle dos mecanismos necessários para a manutenção da sua proliferação. O tecido normal possui um controle bem sincronizado entre suas vias de sinalização para o controle do seu crescimento, tanto sobre os fatores que estimulam, como sobre os que inibem a

proliferação. Conforme bem explicado no artigo em comento, “*desregulando essas sinalizações, as células cancerígenas se tornam donas dos próprios destinos*”.

Para tanto, as células cancerígenas podem utilizar-se de vários mecanismos, dentre eles: produção própria de fatores de crescimento, que fariam o estímulo autócrino; estímulo das células normais do tecido adjacente ao tumor a gerarem fatores de crescimento que são utilizados pelas células cancerígenas; aumento ou diminuição da expressão de receptores de fatores de crescimento na superfície celular e ativação constitutiva de componentes da cascata de sinalização de crescimento celular, através de mutações somáticas (i.e., pós-zigóticas) dos genes ligados a essa cascata de sinalização.

Logrando esse objetivo, essas células estariam aptas a se proliferarem ilimitadamente, não fossem os mecanismos de *feedback* negativos do organismo. Isso aumenta a complexidade para a proliferação das células em questão, pois, além de garantir o seu abastecimento em termos de sinais de crescimento, as células cancerígenas devem impedir o funcionamento dos mecanismos de supressão de crescimento celular.

Assim, a fim de garantir a homeostase do organismo, as cascatas de sinalização de crescimento possuem em sua constituição pontos de controle da sua ação, isto é, se a ação proliferativa atingiu o nível necessário, mecanismos de desativação dessa cascata são ativados. Esses mecanismos de controle podem atuar através da inativação direta de mediadores da cascata ou, indiretamente, por exemplo, pela inativação de componentes que inativam a cascata, possibilitando o crescimento contínuo da célula. Esse controle também é muito importante para garantir a sobrevivência da célula cancerígena. Mas, além disso, ainda será necessário inibir outro mecanismo de controle do organismo, que é a ativação das vias de indução de senescência e/ou apoptose celular.

Mesmo que os mecanismos de controle via *feedback* negativo citados acima não sejam suficientes para controlar o crescimento da célula, o organismo pode recorrer à ativação de outras duas vias de controle celular: senescência e apoptose. O objetivo dessas duas vias de controle seria a manutenção da célula em fase não proliferativa e indução da morte celular programada, respectivamente. As vias de controle celular são propositalmente redundantes, de forma a buscar o controle da proliferação celular até mesmo em células que estejam com alguns mecanismos inibidos. Porém, mais uma vez, as células cancerígenas são capazes, também, de contornar esses mecanismos de controle.

Além desses mecanismos, pode-se citar, ainda, o sequestro de receptores de fatores de crescimento da superfície celular, a alteração da superfície celular, facilitando a entrada de

substâncias específicas, a alteração do fenótipo da célula epitelial para mesenquimal, dentre outros.

A transformação da característica da célula epitelial para mesenquimal facilita a evasão da célula cancerígena, conferindo malignidade ao tumor. Além disso, a liberação de fatores pró-inflamatórios pelas células necróticas do tumor, também demonstrou ter importância para a manutenção da sobrevivência das células cancerígenas. O recrutamento de células do sistema imunológico contribui para a angiogênese, a proliferação celular e aumentam o potencial para invasão de outros tecidos.

Outro marcador importante para a história tumoral é a capacidade de replicação ilimitada. Dessa forma, as células cancerígenas não teriam um número de replicações limitado, aumentando seu potencial carcinogênico. Essa capacidade ocorre em função da superexpressão da telomerase. Em células normais a expressão dessa enzima é praticamente nula, já nas células cancerígenas é elevada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Além da função mencionada acima, de fazer o reparo do desgaste telomérico, essa enzima tem outras funções nas células cancerígenas que também levam à proliferação celular e resistência à apoptose, reparo de danos ao ADN, dentre outras.

Para manter toda essa estrutura tumoral é necessário garantir o suprimento de nutrientes e oxigênio, assim como manter uma rota para a liberação dos detritos metabólicos e dióxido de carbono gerados. Nessa publicação, Hanahan e Weinberg (2011) ressaltam a importância do processo de angiogênese não só no crescimento macroscópico do tumor, mas também para a fase microscópica pré-maligna da progressão neoplásica. Assim como nos outros processos citados até agora, a angiogênese pode ser ativada ou inibida de diversas formas. Esses mecanismos podem ser mediados tanto pela ativação/inativação de oncogênes (exemplo, *Ras* e *Myc*), como por sinais induzidos por células do sistema imunológico, dentre outros.

Na atualização dessa publicação de 2011, Hanahan e Weinberg incluem mais 2 marcadores emergentes do processo neoplásico e duas características que possibilitam a aquisição dos marcadores. Dentre os novos marcadores emergentes estão a desregulação energética celular e o desvio do sistema imunológico. Já as características são: inflamação promovida pelo tumor e instabilidade genômica e mutação.

A reprogramação energética da célula é um processo muito interessante, pois a célula tumoral, mesmo em presença de oxigênio, seria capaz de ativar a glicólise. Além disso, também se considera que existam diferentes subpopulações de células tumorais com distintos mecanismos energéticos que se complementarizam e funcionariam de forma simbiótica. Um

modelo citado nesse artigo seria uma subpopulação que dependa de glicose e secrete lactato e outra subpopulação que dependa de lactato como fonte principal de energia.

O sistema imunológico é uma barreira importante para a formação do tumor. Portanto, de acordo com Hanahan e Weinberg, a habilidade adquirida pela célula tumoral de se proteger do sistema imunológico está sendo proposta como um dos novos marcadores neoplásicos. Dentre esses processos, pode-se citar a prevenção da infiltração de células NK (“*natural killer*”) e CTLs (linfócito T citolítico) através da secreção de TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) e outros fatores imunossupressores (YANG *et al.*, 2010; SHIELDS *et al.*, 2010). Outro mecanismo mencionado é o recrutamento de células inflamatórias que são imunossupressoras, como as células T reguladoras (T_{regs}), dentre outras.

Dentre as duas características que possibilitam o desenvolvimento dos demais marcadores estão, conforme mencionado anteriormente, a instabilidade genômica e estímulo a mutações e a promoção da inflamação pelas células cancerígenas. A primeira característica gera mutações randômicas, incluindo rearranjo cromossômico, que possibilitam as alterações celulares que permitem a progressão tumoral. Já a inflamação induzida pelas células do sistema imunológico inato pode dar suporte aos vários marcadores da neoplasia citados anteriormente, através do suprimento de fatores de crescimento; fatores de sobrevivência, que limitam a morte celular; fatores pró-angiogênicos; enzimas modificadoras da ME, que facilitam a angiogênese, invasão e metástase; dentre outros.

Além disso, o contínuo acúmulo de evidências mostra que o tecido tumoral contém uma população minoritária de células responsáveis pela iniciação, crescimento e recorrência do tumor. Estas são chamadas “células-tronco tumorais”. Ensaio funcionais identificaram capacidades de autorrenovação e iniciação do tumor nessas células. Além disso, estudos recentes revelaram que estas células são um dos fatores responsáveis pela resistência do tumor à quimioterapia (VINOGRADOV; WEI, 2012; WANG, K. *et al.*, 2013).

2.3.3 Desafios e perspectivas na terapêutica do câncer

Levando-se em consideração a complexidade da patogenia do câncer explicada acima, dentre os principais desafios na terapêutica do câncer pode-se citar: o baixo benefício clínico das terapias convencionais, sua elevada toxicidade e o rápido desenvolvimento de resistência aos tratamentos disponíveis (CHARI, 2008; OBEROI *et al.*, 2013; WANG *et al.*,

2014). A utilização de combinações de tratamentos, alternância de ciclos e altas doses de quimioterapias são estratégias empregadas na prática clínica para tentar superar esses desafios (FREI *et al.*, 1998). Dentre os tratamentos disponíveis atualmente, pode-se citar: quimioterapia, radioterapia, cirurgia, agentes biológicos e terapias moleculares, além dos novos avanços tecnológicos nas áreas de terapia celular, terapia gênica e terapia molecular dirigida.

Outro desafio, conforme mencionado anteriormente, é a rápida adaptação das células tumorais às pressões do seu microambiente e, dessa forma, sua esperada variabilidade genômica, epigenômica e em relação às suas interações com o seu microambiente. Essa variabilidade determina, portanto, a existência de uma série de tipos de cânceres, com diferentes assinaturas moleculares, o que acarreta distintos fatores prognósticos e marcadores biológicos, que conferem peculiaridade aos pacientes, ainda que sejam portadores do “mesmo tipo celular de câncer”, interferindo, desta forma, na efetividade e tolerabilidade aos tratamentos (SEOANE *et al.*, 2014).

Além disso, levando em consideração a dificuldade de reverter a resistência das células-tronco tumorais com as terapias convencionais, conforme mencionado anteriormente, pode-se notar o possível benefício da nanotecnologia nessa área. Conforme demonstrado em alguns trabalhos, alguns nanodispositivos estão sendo explorados para direcionar a liberação de fármacos, seletivamente, para essa população de células. Esses estudos têm mostrado resultados promissores. (VINOGRADOV; WEI, 2012; WANG, K. *et al.*, 2013).

Diante das tantas particularidades de cada paciente, a sociedade científica busca o desenvolvimento de terapias cada vez mais direcionadas. Isso mostra que, para a medicina, mais especificamente para a oncologia, não se pode lidar com medicamentos desenvolvidos seguindo a filosofia de um medicamento servir para todos os pacientes (“one size fits all”). Atualmente, existe informação suficiente para embasar a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que venham tornar os tratamentos progressivamente mais especializados.

Mesmo com todo o desenvolvimento focado na especialização dos tratamentos, pode-se notar que as limitações desses medicamentos ainda não foram superadas e que muitos dos tratamentos ainda são realizados por tentativa e erro, no próprio consultório médico. Essas limitações têm grande impacto na resposta clínica do paciente e, por consequência, em sua sobrevida e qualidade de vida.

De forma ampla, pode-se citar como pontos de melhorias para as terapias oncológicas:

- 1) Redução da distribuição sistêmica inespecífica dos fármacos.

- 2) Aumento da concentração do fármaco no sítio tumoral.
- 3) Redução da toxicidade associada ao tratamento.
- 5) Melhoria dos sistemas de monitoramento da resposta terapêutica.

Tendo em vista os recentes avanços da nanotecnologia, espera-se que essa nova abordagem possa ser útil para reduzir as deficiências dos tratamentos convencionais disponíveis e, até mesmo, para alterar o padrão de tratamento oncológico. Esses benefícios são esperados através de planejamento químico e físico de diversos componentes das nanopartículas.

Os sistemas de nanopartículas são meticulosamente desenvolvidos levando em consideração sua metabolização, imunogenicidade, tempo de circulação, citotoxicidade e permeabilidade ao endotélio. Sendo assim, é importante ressaltar que, para que as nanopartículas possam atingir seu objetivo de forma simplificada, precisam escapar da filtração renal, do sistema imunológico, do metabolismo hepático e serem entregues no sítio tumoral em concentração terapêutica (PORTNEY; OZKAN, 2006).

Uma grande variedade de nanomedicamentos está atualmente sob investigação, incluindo nanopartículas poliméricas ou não poliméricas, pontos quânticos, nanotubos de carbono, lipossomas, dendrímeros e micelas. Segue na Figura 4 abaixo, a linha do tempo com o desenvolvimento e aprovação de alguns nanomedicamentos e diagnóstico apresentado por Shi *et al.* (2011).

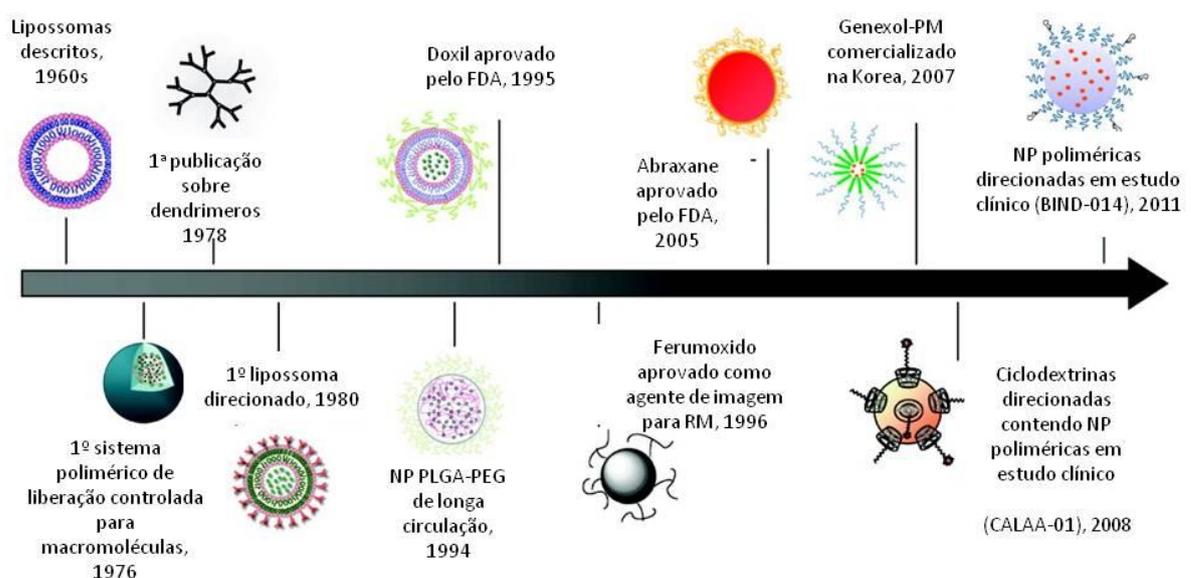


Figura 4: Desenvolvimento e aprovação de alguns produtos nanotecnológicos. Fonte: SHI *et al.*, 2011.

Estudos ilustram algumas classes de ligantes passíveis de serem adicionados às NPs para melhorar o direcionamento e liberação dos fármacos no seu local de ação. Dentre eles, vale citar: pequenas moléculas, peptídeos, anticorpos, proteínas manipuladas, aptâmeros (moléculas de ARN ou ADN que se ligam com alta afinidade a íons, oligossacarídeos, proteínas e glicoproteínas) (FRIEDMAN *et al.*, 2013). São examinados, ainda, métodos selecionados de fabricação e aplicações para nanomedicina de nanodispositivos funcionais capazes de lidar com culturas de células e/ou tecidos e produzir partículas. Na oncologia, esses dispositivos, utilizados em conjunto com NP, ligados a anticorpos monoclonais, podem ser usados para auxiliar na detecção precoce de mutações tumorais, metástases e recaídas do paciente (HASHIMOTO *et al.*, 2013).

Conforme ressaltado por Hashimoto e colaboradores (2013), algumas características dos nanodispositivos mencionadas por eles, tais como a miniaturização, a capacidade para gerar culturas tridimensionais e imitar microambientes de órgãos específicos, por exemplo, fazem esta tecnologia promissora para a rápida avaliação da eficácia e toxicidade dos nanomateriais. Além disso, o potencial para reproduzir com precisão os ambientes fisiológicos que ocorrem *in vivo* pode reduzir a dependência dos modelos animais em testes toxicológicos e farmacológicos.

Outra terapia para o câncer que está em desenvolvimento é a interferência por ARN (RNAi). Nesta técnica é utilizada uma fita dupla de ARN, que se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar que está localizada no ARN mensageiro alvo. Dessa forma, ocorre a inibição da tradução. Essa terapia se embasa em um mecanismo natural da célula, conhecido como silenciamento gênico. A célula utiliza esse mecanismo para controlar o funcionamento dos genes e para manter a integridade genômica.

Muitos estudos têm utilizado o RNAi para bloquear a expressão de genes-alvo de forma específica e, assim, transformar a terapia do câncer. Mas, para isso, é necessário o desenvolvimento de técnicas para se introduzir o RNAi na célula-alvo, de forma a manter sua potência, especificidade e estabilidade frente às nucleases.

Atualmente, propõem-se modelos de liberação de RNAi com base em NN. Um exemplo destas propostas é o modelo MSV (*multistage vector*)/EphA2. Nesse modelo, proposto por Shen e colaboradores (2013), o objetivo seria silenciar a expressão do gene *EphA2*, cuja expressão está relacionada ao mal prognóstico de alguns tumores. Para isso, os pesquisadores propuseram a utilização de partículas discoidais de silicone poroso, preenchidas com o RNAi lipossomal, e foi demonstrada a eficiência desse sistema para a liberação do

RNAi no citoplasma celular. Porém, os pesquisadores ressaltam que esse modelo merece ser mais bem estudado para sua aplicação na clínica médica.

Dentre as várias utilizações de nanomateriais para diversas doenças, cabe ressaltar a importância da utilização de lipossomas. No presente trabalho será revisado o desenvolvimento, aprovação e desempenho na prática clínica do primeiro nanomedicamento aprovado para o tratamento do câncer - o DOXIL[®]. Esse medicamento é uma renovação da formulação da doxorubicina utilizando lipossomas peguilados como será exposto mais adiante. Porém, cabe ressaltar nesse momento a origem e características dos lipossomas.

Em 1961 o pesquisador Alec D. Bangham caracterizou um sistema de vesículas lipídicas, que mais tarde foi denominada como lipossomas. Os lipossomas são pequenos compartimentos esféricos delimitados por bicamada fosfolipídica. Seu tamanho, número de camadas e composição lipídica são importantes para a definição de suas características, como: fluidez, permeabilidade, estabilidade e estrutura. As formulações lipossomais permitem a utilização de sua fase aquosa e lipídica para a incorporação de agentes terapêuticos com diferentes características. Além disso, permite a adaptação do seu tamanho e composição, para facilitar sua distribuição ao tecido alvo. Esse sistema terapêutico tem sido utilizado em diversos medicamentos, incluindo quimioterápicos, antibióticos, agentes quelantes, hormônios peptídicos, enzimas, proteínas, vacinas, materiais genéticos, dentre outros.

Atualmente existem vários medicamentos e vacinas no mercado com base em lipossomas para diversas indicações médicas: Ambisome[®] (anfotericina B/infecção fúngica), Abelcet[®] (anfotericina B/infecção fúngica), Amphotec[®] (anfotericina B/infecção fúngica), DaunoXome[®] (daunorrubicina/câncer), Lipo-dox (doxorubicina/câncer), Myocet[®] (doxorubicina/câncer), Visudyne[®] (verteporfina/degeneração macular), Depocyt[®] (citarabina/meningite neoplásica), DepoDur[®] (morfina/dor), Epaxal[®] (vírus e Hepatite A inativado/Hepatite A), Inflexal[®] (hemaglutininas inativada do vírus de Influenza tipo A e B) (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

A base para que essas nanoestruturas reduzam a toxicidade, associada com a terapia do câncer, pode ser atribuída à sua capacidade para transportar grande quantidade de fármaco, ligantes direcionadores multivalentes, conduzindo, assim, a uma maior especificidade para os tecidos-alvo, o que possibilita combinar diferentes tratamentos em um mesmo dispositivo e permite contornar os mecanismos de resistência tradicionais (AKHTER *et al.*, 2013). Ao passo que se vislumbram tantas vantagens com a utilização dos nanomateriais, deve-se considerar também seu perfil de toxicidade, o que impõe a necessidade de uma extensa

avaliação antes da exposição em massa dos pacientes aos nanomedicamentos (AKHTER *et al.*, 2013).

2.4 Nanotoxicologia

2.4.1 Importância e definição

Especialmente importante para o desenvolvimento da nanomedicina é a compreensão dos efeitos toxicológicos destes novos materiais e dispositivos para os pacientes. Isto porque a toxicologia estuda as intoxicações, os agentes que as produzem, seus sintomas, seus efeitos, seus antídotos e seus métodos de análise, visando a proteção dos indivíduos expostos sendo que, quando esta expressão é utilizada no contexto das nanotecnologias, utiliza-se o termo nanotoxicologia, por ser mais específico (DONALDSON *et al.*, 2004).

Um dos princípios para a diferenciação da toxicologia como nanotoxicologia é que os materiais que não se mostram prejudiciais em sua forma macroscópica podem ser tóxicos em nanoescala (DONALDSON *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2010). Um exemplo clássico desse efeito é visto com o ouro, por exemplo. Ouro em macro escala, é normalmente inerte, já o material nano-particulado de ouro é altamente reativo e, por isso, útil para aplicação em exames de imagens e biodistribuição de fármacos.

Notório, portanto, que a nanotoxicologia venha ganhando importância recentemente (anos após a entrada do primeiro produto com base em nanotecnologia no mercado), posto que, atualmente, está disponível ao consumidor um grande número de produtos com base em nanotecnologia (SHI *et al.*, 2011). E, no entanto, sabe-se muito pouco sobre os possíveis efeitos da exposição aguda e prolongada a esses materiais. Até porque, como descrito, partículas do mesmo material podem demonstrar um comportamento muito diferente quando em contato com o organismo e esse efeito pode estar relacionado, por exemplo, à sua superfície, carga, ao tamanho, conforme mencionado anteriormente. Isso faz com que os estudos nanotoxicológicos destes materiais sejam mais complexos (CANELAS *et al.*, 2009; HARPER *et al.*, 2011).

Esse é um ponto muito importante para demonstrar a complexidade da nanotoxicologia. Deve-se considerar, por exemplo, a análise toxicológica do fármaco ou

agente diagnóstico que está sendo carregado, as características das NPs e, além disso, as possíveis alterações de superfície programadas para melhorar o desempenho desses dispositivos, assim como as alterações de superfícies que acontecem espontaneamente, após a administração do nanomedicamento, pela interação da NP com o microambiente biológico, por exemplo (DONALDSON *et al.*, 2002).

Dentre os estudos, destaca-se a importância da análise da rota de exposição; diferenças na cinética por causa do tamanho ou carga da superfície do material; exposição aumentada por unidade de massa (relação superfície/volume elevada); distribuição aos tecidos; diferenças nos mecanismos de captação celular; metabolismo; *clearance*; efeito do meio biológico nas propriedades dos nanomateriais; correlação entre os estudos *in vitro* e *in vivo* (JOHN *et al.*, 2007; STRATMEYER *et al.*, 2010); interferência dos nanomateriais nos testes disponíveis atualmente; aderência dos nanomateriais aos utensílios médicos e de laboratório; confirmação da captação intracelular dos nanomateriais ou agregados (DE ZWART *et al.*, 2004; LANONE; BOCZKOWSKI, 2006; HAGENS *et al.*, 2007).

Além disso, cabe ressaltar a importância dos estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade. Os estudos de genotoxicidade são essenciais para o desenvolvimento de novos produtos. Esses estudos devem ser realizados nas etapas iniciais do processo de desenvolvimento dos medicamentos, pois, dessa forma, pode orientar o pesquisador sobre o potencial genotóxico e/ou carcinogênico da molécula e auxiliar na adaptação da estrutura do fármaco para que se obtenha uma estrutura menos tóxica. Os agentes genotóxicos são definidos funcionalmente por sua capacidade de alterar a replicação e a transmissão da informação genética. Essa alteração pode ser originada por vários processos, entre os quais podem-se citar: danos ao ADN, indução de mutações e de aberrações cromossômicas (COMBES, 1992; NATH; KRISHNA, 1998; GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; HARTMANN *et al.*, 2001; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002).

A indução de carcinogenicidade pode ser originada por mecanismos genotóxicos e não-genotóxicos. Dessa forma, é demonstrada a importância de se utilizar tanto os estudos de genotoxicidade, quanto os de carcinogenicidade. De forma geral, quando um fármaco apresenta resultado positivo nos dois tipos de testes, pode-se concluir que se trata de um carcinógeno genotóxico. Os fármacos que são negativos nos dois testes são considerados não-carcinogênicos e não-genotóxicos. Os fármacos que demonstram carcinogenicidade mesmo na ausência de genotoxicidade são considerados carcinógenos não-genotóxicos. Já os que demonstram genotoxicidade, mas não apresentam carcinogenicidade, são mais difíceis de

serem classificados e, provavelmente, precisarão de outras análises para serem classificados (NATH; KRISHNA, 1998; SNYDER; GREEN, 2001).

Pode-se notar um alinhamento entre essas necessidades e a crescente publicação de artigos nessas áreas. Dentre estes estudos, podem-se citar diferentes metodologias, dentre elas: citotoxicidade, utilizando diferentes linhagens de células, tempos de incubação e ensaios colorimétricos com diferentes nanomateriais (LEWINSKI *et al.*, 2008; KROLL *et al.*, 2011). Neste sentido, de acordo com Lewinski, assim como Kroll, a toxicidade *in vitro* dos nanomateriais analisados não foi atribuída a uma propriedade físico-química definida e a identificação acurada da citotoxicidade desses materiais requer uma matriz baseada em diferentes linhagens celulares e desfechos/objetivos (KROLL *et al.*, 2011).

Ainda no que tange à nanotoxicologia, é imperioso analisar os protocolos envolvidos nesses testes de toxicidade, de forma que se possa entender o racional para a escolha da dose nesses estudos. A dose é um fator chave na toxicologia e muitos dos estudos utilizam doses que não correspondem ao que seria utilizado na prática clínica e, portanto, poderiam gerar dificuldade para a aplicação desses dados durante o processo decisório sobre a segurança do medicamento (OBERDORSTER, 2010; ELSAESSER; HOWARD, 2012). Por isso, cabe parafrasear Paracelso, "a dose faz o veneno", uma vez que sabemos que substâncias tóxicas podem ser inofensivas em pequenas doses e substâncias inofensivas podem ser tóxicas quando consumidas em excesso (BORZELLECA, 2000). Existe ainda muita discussão sobre os possíveis métodos que seriam apropriados para avaliar a "dose" de nanomedicamentos. Na toxicologia clássica, quase sempre, a dose relaciona-se com a massa, assumindo-se que a reatividade química dos nanomateriais deve ser proporcional à superfície de contato das partículas. Em outras palavras, quanto maior a superfície de contato, maior a sua reatividade química (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012).

Ainda nesse sentido, vale ressaltar a importância da definição da NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) e LOAEL (*lowest-observed-adverse-effect level*) para os nanomedicamentos. A NOAEL é a dose máxima administrada onde não é observado aumento estatística e/ou biologicamente significativo da frequência ou gravidade dos eventos adversos relacionados ao tratamento proposto quando comparado ao grupo controle. A LOAEL é a dose mais baixa de exposição onde é observado um aumento estatística ou biologicamente significativo da frequência e/ou gravidade dos eventos adversos relacionados ao tratamento em estudo quando comparado ao grupo controle (EPA, 2014).

2.4.2 Impacto toxicológico dos nanomateriais no organismo

A nanotecnologia está sendo desenvolvida de forma a melhorar os benefícios clínicos dos tratamentos já existentes, através da otimização de suas propriedades terapêuticas e, principalmente, da minimização dos efeitos tóxicos, o que induz o aumento da adesão do paciente ao tratamento, sendo, portanto, de suma importância para a medicina como um todo.

Não há dúvidas, portanto, quanto à importância do estudo da nanotoxicologia, até mesmo porque, conforme citado por Wick e colaboradores (2010), a exposição da população a nanopartículas não é uma ação nova, já que sempre existiu, eis que gerada pelo próprio meio ambiente, como pelos vulcões, incêndios florestais, poeira do deserto, por exemplo. Além do que essa exposição tem sido progressivamente aumentada após a revolução industrial.

Frente ao grande investimento em nanotecnologia que está sendo vivenciado, pode-se esperar que essa exposição seja intensificada, sendo imperioso que os estudos acerca da nanotoxicologia sejam intensificados. Assim, a caracterização dos nanomateriais e estudos de toxicologia têm ganhado importância crescente para o entendimento de como as características físico-químicas das nanopartículas estão relacionadas com sua resposta toxicológica, como na inflamação, por exemplo.

Para se ter um panorama abrangente dos possíveis impactos toxicológicos dos nanomedicamentos, deve-se levar em consideração o ciclo de vida completo do nanomaterial desde sua origem, produção, utilização, até sua eliminação ou reciclagem. Esse processo é importante, pois, dependendo da fase desse ciclo, podem existir alterações na amplitude da exposição ambiental ou humana ao material e isso teria um impacto direto no risco esperado. Logo, torna-se importante analisar com cuidado todas as características dos materiais que serão utilizados no nanossistema, assim como sua forma de administração, metabolização, eliminação e, uma vez no meio ambiente, sua decomposição. Além disso, as nanopartículas podem causar danos diretos e indiretos ao ADN (físicos ou químicos). Através dos nanomateriais pode-se induzir a resposta inflamatória crônica, que pode levar à geração excessiva de agentes que promovem o estresse oxidativo.

De acordo com Donaldson e colaboradores (2004) e Arora e colaboradores (2012), as nanopartículas são mais propensas a interagir com as células e os vários componentes biológicos e serem distribuídos no organismo, o que aumenta suas chances de interagir com diversos órgãos e ativar respostas inflamatórias e imunológicas. Não existe interação somente

com a célula-alvo, mas com todas as estruturas biológicas que podem estar no percurso da NP desde a sua administração até a sua eliminação.

Deve-se levar em consideração que o microambiente celular envolve diversas estruturas tridimensionais: outras células, a matriz extracelular (ME), proteínas e outros fatores solúveis ou ligados à ME. Dentre os componentes da ME estão o colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas que têm por função principal manter a estrutura da célula. Ademais, frisa-se por oportuna a necessária consideração dos poros, fibras e cristas da membrana basal, razão pela qual cabe ressaltar a importância de se estudar a interação das NPs como um todo no organismo (ARORA *et al.*, 2012).

Dentre as interações com o organismo devem se priorizar as que podem trazer algum impacto à segurança do paciente. Assim, como observado por Campagnolo e colaboradores (2012) existem indicativos de que a exposição a esses novos materiais pode causar efeitos adversos às células embrionárias, por isso deve-se levar em consideração seu impacto no sistema reprodutivo e no desenvolvimento embrionário humano, considerando-se, para tanto, as principais características físico-químicas que podem afetar os sistemas biológicos como: presença de contaminantes e desestabilização da nanopartícula, tamanho, dose, presença de grupos funcionais, influência do solvente utilizado e potencial de agregação/aglomeração, formação da corona. Conforme mencionado por Delgado e Paumgarten (2013), sabe-se muito pouco sobre a captação e transferência de nanopartículas através da placenta e seu impacto sobre o desenvolvimento do embrião e feto humanos. Os dados existentes nessa área advêm de estudos em invertebrados, vertebrados não-mamíferos, mamíferos e alguns poucos dados de estudos *ex vivo*. Portanto, deve-se ter cuidado ao extrapolar esses resultados para a análise do impacto das nanopartículas em humanos. Dentre os principais motivos pode-se citar as diferenças no desenvolvimento e função da placenta dos diferentes modelos utilizados.

Outro ponto importante que deve ser considerado é a tecnologia de superfície desses materiais. Dentre essas tecnologias pode-se citar a utilização de polietilenoglicol (PEG). O PEG auxilia no mascaramento de epítomos imunológicos e sítios de degradação, obtendo-se, assim, maior tempo de meia vida plasmática, redução de imunogenicidade e melhor eficácia biológica *in vivo* (CHENG *et al.*, 2013). Deve-se ter cuidado ao afirmar que um produto é não-tóxico ou não-imunogênico, como no trabalho de Ding *et al.* (2011). Neste trabalho, os pesquisadores indicam que as micelas poliméricas peguiladas são amplamente utilizadas por serem, dentre outras características, não-tóxicas e não-imunogênicas. Embora esta afirmativa não esteja referenciada no mencionado trabalho, analisando informações publicadas em outras fontes, pode-se dizer que estes componentes podem ser considerados praticamente não-

tóxicos em cenários específicos, o que não deveria ser generalizado para qualquer situação. Sabe-se que existem muitos polímeros de polietilenoglicol em termos de composição e de tamanho, o que poderia modificar de alguma forma a atividade destes compostos (KABANOV *et al.*, 2005; KOHN; WELSH; KNIGHT, 2007; KIM *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2012; WEI; MEHTALA; PATRI, 2012).

Ainda nesse sentido, existem outros trabalhos, como o de Ishida e Kiwada (2013), Shimizu *et al.* (2012) e Garay *et al.* (2012) mostrando que sistemas conjugados ao PEG podem induzir a formação de anticorpos contra PEG (principalmente IgM), o que sugere que estes compostos devam ser estudados com maior profundidade. Além disso, o estudo de Garay e colaboradores (2012) discute a possível relação do aumento de anticorpo antiPEG no sangue de doadores saudáveis, nas últimas duas décadas, com melhores técnicas de detecção ou, possivelmente, com a maior exposição desta população a produtos (cosméticos, medicamentos e alimentos) contendo PEG.

O efeito em comento foi notado também no trabalho de Ishida e Kiwada (2008), porém, neste caso, os lipossomas peguilados não continham medicamento, mostrando que esta indução de imunogenicidade estaria ocorrendo realmente pelo complexo lipossoma-PEG. E mais, este trabalho mostra que, assim como são importantes as características físico-químicas do complexo (plataforma-medicamento), também se devem considerar aspectos do esquema posológico, como o intervalo entre as doses, por exemplo.

Cho e colaboradores (2012) demonstram a relação entre os critérios físico-químicos, como solubilidade e potencial *Zeta* da NP, na extensão da inflamação pulmonar aguda de 15 nanopartículas com base em metal ou óxido de metal (Al_2O_3NP , AgNP, Co_3O_4NP , dentre outras), assim como ressalta a importância da corona proteica na caracterização do potencial *Zeta* da NP.

Como já demonstrado na literatura, a adsorção de biomoléculas na superfície da nanopartícula conduz à formação de uma camada estável de biomoléculas, o que tem sido chamado de “corona” ou “coroa” (figura 5). Dependendo da biomolécula adsorvida, a corona pode ser mais ou menos estável, pois depende da afinidade da biomolécula com a nanopartícula e sua concentração (CEDERVALL *et al.*, 2007a; CEDERVALL *et al.*, 2007b; LAI *et al.*, 2012).

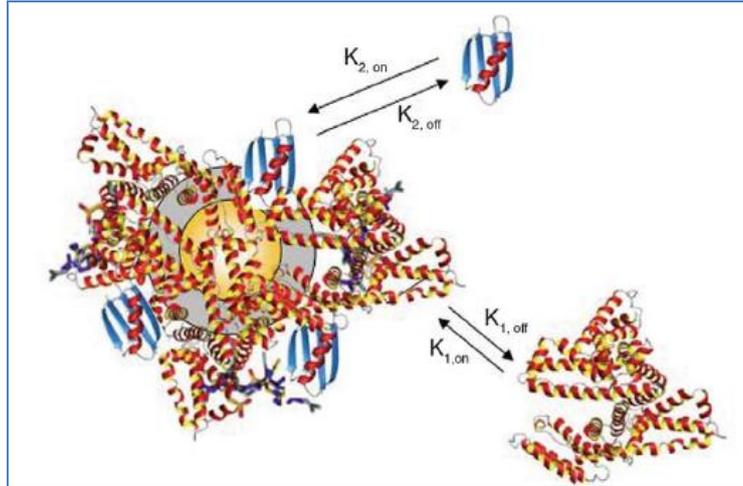


Figura 5: Formação da Corona Proteica. Fonte: LYNCH; DAWSON, 2008.

Do ponto de vista toxicológico, a análise dos materiais adsorvidos na superfície da nanopartícula é muito importante, tendo em vista que, uma vez que as nanopartículas entram em contato com o fluido biológico, suas características sofrem alterações e já não podem mais ser consideradas somente como a nanopartícula *per se*. Dentre as proteínas que formam a corona pode-se citar: albumina, imunoglobulinas, lipoproteínas (apolipoproteínas AI, AII, AIV, B100, CI, CIII, D, E, F, H e J), proteínas e fatores do complemento, fibrinogênio, plasminogênio, proteína de ligação da manose, antitripsina alfa 1 e fatores de coagulação (V, XI, precalicreína, antitrombina III etc.) (CEDERVALL *et al.*, 2007a, b; LAI *et al.*, 2012).

Além do mais, já foi demonstrado na literatura que a adsorção de fosfolípidios (surfactante pulmonar) à superfície da NP é muito importante para a via de administração inalatória. Portanto, a corona é parte muito importante na definição das propriedades terapêuticas e tóxicas dos nanocompostos (LYNCH *et al.*, 2007; GASSER *et al.*, 2010; ELSAESSER e HOWARD, 2012).

Pode-se esperar, à vista disso, alguma correlação entre as proteínas adsorvidas na superfície das nanopartículas e algumas respostas biológicas como, por exemplo: risco cardiovascular, influência no metabolismo lipídico, Diabetes Melitus tipo II, Doença de Alzheimer e outras doenças amiloides (HERZ; CHEN, 2006; BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; CEDERVALL *et al.*, 2007b).

A influência da corona proteica das nanopartículas em sua eficácia e tolerabilidade é extremamente importante e pouquíssimo estudada. Em termos de toxicidade, deve-se levar em consideração a publicação de DONALDSON e colaboradores (2010) através da qual se denota o papel da corona da nanopartícula na indução da genotoxicidade (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010).

Dada a importância da corona proteica, Lai e colaboradores (2012) mostraram que o estudo da modulação da superfície das partículas pelos fluidos biológicos, através de técnicas proteômicas de espectrometria de massas (dentre outras técnicas emergentes), é fundamental para melhorar o desenvolvimento dessas nanopartículas. Com essa informação, pode-se começar a analisar os padrões de adsorção, mesmo que ainda não sejam totalmente entendidos e nem fácil de correlacionar com a informação disponível atualmente.

Mantendo o mesmo raciocínio, mas agora observando pela “ótica” das células, devemos levar em consideração o que foi descrito por Mahmoudi e colaboradores (2012) e por Laurent e colaboradores (2013). Nesse estudo, sabendo-se que o complexo corona-NP pode ficar conjugado por um período de tempo prolongado (horas), os pesquisadores mostram que, na verdade, o que a célula reconhece é a corona proteica e não a superfície “nua” (planejada) do nanomaterial. Ademais, como essa corona sofre constantes alterações no seu conteúdo, devido às trocas com o meio, essa célula pode interagir com o nanossistema em um momento, mas pode não identificá-lo em outro dado momento. Mais do que isso, o trabalho citado acima leva em consideração que o organismo humano possui aproximadamente 200 tipos de células diferentes e essas células podem apresentar diferentes mecanismos de captação celular e, por consequência, impactar na toxicidade apresentada. Portanto, o que será reconhecido depende da célula exposta e da composição momentânea do sistema nanoparticulado em interação, podendo acarretar em diferenciados perfis de identificação e processamento relativamente ao nanossistema analisado *in vivo* ou *in vitro*.

Reforçando o exposto acima, os trabalhos de Laurent e colaboradores (2013) e Mahmoudi e colaboradores (2012) mostraram a interferência do meio na composição dos nanossistemas. Além disso, mostram que deve ser levada em consideração não só a composição proteica, mas também as alterações de temperatura do organismo como, por exemplo, ocorre no ciclo circadiano. Este estudo confirma, ainda, que a captação, dispersão e toxicidade celular das nanopartículas variam significativamente com o aumento ou diminuição da temperatura do organismo. Aparentemente, este fator não tem sido muito estudado até agora.

Maiorano e colaboradores (2010) demonstram os desafios dos protocolos, para avaliações toxicológicas *in vitro*, de um sistema que está constantemente sofrendo alterações, conforme descrito anteriormente. A dinâmica de formação e manutenção da corona proteica tem impacto significativo na resposta biológica de testes toxicológicos. Sendo este entendimento, portanto, essencial para a padronização de testes toxicológicos.

Ainda nesse sentido, analisando a correlação de testes toxicológicos *in vitro* e *in vivo* para nanossistemas, Monteiro-Riviere e colaboradores (2013), também demonstram a importância de se ter cuidado ao extrapolar os dados resultantes de uma avaliação *in vitro* para determinar o uso *in vivo* do sistema nanoparticulado, pois dentre outros fatores existem diferenças entre os meios utilizados.

As mesmas características que tornam os nanomateriais atrativos para a terapêutica e diagnóstico também estão associadas com seus potenciais impactos à saúde e ao meio ambiente (MA; ZHAO; LIANG, 2011).

A toxicologia tradicional está, de forma geral, muito bem estabelecida e possui procedimentos e metodologias bem caracterizados. Assim, faz-se necessário entender o quanto desses procedimentos e metodologias seria aplicável à nanotoxicologia.

Portanto, mesmo que a implementação da nanotecnologia seja de extrema importância para o crescimento da economia global, deve-se lidar de forma consciente com os possíveis impactos na saúde e na segurança do meio ambiente (NEL *et al.*, 2013).

2.4.3 Toxicologia do século XXI

Uma nova visão no campo da Toxicologia vem surgindo no século XXI e ganhando maior destaque no meio científico e regulatório, sobretudo na Europa e nos Estados Unidos. Esta tendência, conhecida mundialmente como Tox-21, prevê o desenvolvimento de estratégias integradas, inovadoras e mais precisas visando a predição de possíveis efeitos induzidos por xenobióticos sobre a saúde humana e um maior entendimento acerca dos mecanismos de ação envolvidos nestes processos (MORALES, 2008; SCHMIDT, 2009).

Um marco importante neste contexto deu-se com a publicação do documento intitulado "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy" pelo National Research Council (NRC) no ano de 2007 (KREWSKI *et al.*, 2010).

No ano seguinte, um importante acordo de parceria foi estabelecido entre três agências norte-americanas: o National Toxicology Program (NTP), o National Institute of Health Chemical Genomics Center (NCGC) e o Environmental Protection Agency (EPA). O acordo, que previa a contribuição de cada uma das agências em sua área de competência, teve como mote principal o desenvolvimento de ferramentas para o desenvolvimento mais rápido e eficiente de abordagens preditivas inovadoras. Dentre elas, pode-se citar: a padronização de

modelos de cultura celular e de órgãos isolados, a utilização de avaliação por ferramentas computacionais e ensaios automatizados (QSAR - *Quantitative Structure-activity Relationship*; HTS - *High-throughput Screening*), os projetos de farmacogenômica, proteômica e metabolômica, dentre outras (COLLINS; GRAY; BUCHER, 2008; HARTUNG, 2011; STEPHENS, 2013).

O Programa Tox-21 propõe ainda o mapeamento completo do conjunto de vias bioquímicas envolvidas em respostas biológicas decorrentes dos mais diversos tipos de exposição humana a xenobióticos, entendendo que tais vias caracterizam-se por um número finito de possibilidades. A identificação dessas vias bioquímicas, portanto, significa um avanço no processo de identificação de possíveis efeitos adversos, que por sua vez, impactam positivamente na construção do processo de avaliação do risco associado a determinado xenobiótico. É de se esperar, que quanto mais preciso for o processo de avaliação do risco, mais assertivas serão as agências regulatórias responsáveis pelos processos de gerenciamento do risco (HARTUNG, 2011).

Uma das tecnologias mais recentes capazes de substituir o uso animais em testes farmacológicos e toxicológicos é o cultivo de tecidos humanos em biorreatores de perfusão microfluídica controlados por computador (também conhecido como “Human on a Chip”). O objetivo é cultivar simultaneamente vários organóides humanos que, em conjunto, reajam a xenobióticos de forma semelhante ao organismo humano. No estado da arte atual, é possível cultivar simultaneamente até dois tecidos humanos tais como: epiderme e tecido hepático. No futuro, espera-se cultivar simultaneamente até dez tecidos (MARX, 2012).

A utilização dessas estratégias integradas, inovadoras e mais precisas pode ser fundamental para o desenvolvimento da nanomedicina. Como mencionado anteriormente a grande variabilidade e a velocidade com que se desenvolvem novos nanomateriais podem inviabilizar a análise de risco-benefício desses materiais para sua comercialização segura. É de se imaginar que nenhum pesquisador seja a favor do uso de testes toxicológicos ultrapassados e do uso indiscriminado de animais nas pesquisas. Se a toxicologia vem utilizando testes que foram propostos há mais de 40 anos (testes *in vitro*; testes *in vivo*; estudos epidemiológicos) e obtendo resultados que contribuem com a análise risco-benefício dos produtos químicos, não se poderia dizer que não são válidos, porém podem não ser completos. Através da nanotecnologia novos materiais são criados e novas aplicações dos materiais que já existem são possibilitadas. Dessa forma, não se pode negar a importância de avaliar como os novos adventos do século XXI poderiam contribuir para impulsionar os métodos e procedimentos toxicológicos utilizados atualmente. Não se espera que todos os

procedimentos sejam alterados repentinamente, porém, é necessário que os estudos de validação desses procedimentos sejam incentivados, mesmo que seja para provar que os métodos tradicionais continuam sendo a melhor opção (HARTUNG, 2009; PANNEERSELVAM, CHOI, 2014).

Sabe-se que os estudos realizados em modelos animais não-humanos e em cultura celular possuem suas limitações (as diferenças interraciais e a falta de representatividade do organismo como um todo dos modelos celulares, por exemplo), mas essas informações, em combinação com os dados obtidos por modelos *in silico*, podem aproximar as estimativas de risco dos compostos da realidade, conforme demonstrado por Fröhlich e Salar-Behzadi (2014).

A toxicologia computacional (métodos *in silico* de predição da toxicidade) envolve não só a criação de *softwares* para a avaliação toxicológica, mas também a criação e manutenção de banco de dados (onde se possa pesquisar por estrutura molecular). Além disso, muitos desses modelos são criados levando-se em consideração critérios fisiológicos específicos dos humanos como, por exemplo, ventilação alveolar, débito cardíaco, fluxo sanguíneo em diferentes órgãos, taxa metabólica, dentre outros. Além disso, existem modelos *in silico* capazes de avaliar os efeitos toxicológicos de misturas de produtos químicos (Modelos PBPK - *Physiologically Based Pharmacokinetic*) (HARTUNG, 2009; PANNEERSELVAM, CHOI, 2014).

Modelos matemáticos (*in silico*) podem, por exemplo, ser usados para a análise da deposição de compostos por via inalatória e oral podendo otimizar o desenvolvimento de aerossóis. No estudo de Carrigy e colaboradores (2014) é demonstrada a importância dessa análise para o entendimento dos diferentes mecanismos de deposição no trato respiratório do ponto de vista pediátrico.

Além disso, vale ressaltar o papel dos métodos *in silico* (QSAR, por exemplo) para o agrupamento dos nanomateriais em categorias, o qual é importante para agilizar o planejamento dos testes toxicológicos para fins regulatórios e para a interpretação dos resultados obtidos nessas avaliações. Essa categorização envolve não só a determinação da relação atividade-estrutura dos compostos, mas todo o ciclo de vida do nanomaterial (ARTS *et al.*, 2014).

Cabe ressaltar que a toxicologia computacional já é utilizada no contexto regulatório (REACH, por exemplo) e que há *softwares* desenvolvidos e validados por agências mundialmente reconhecidas (USEPA - U. S. Environmental Protection Agency; OECD -

Organization for Economic Co-operation and Development; ECHA -European Chemical Agency) (HARTUNG, 2011).

2.5 Panorama da nanotecnologia nos processos regulatórios dos Estados Unidos, Europa e Brasil

A questão da evolução da metodologia regulatória para lidar com tecnologias emergentes não é nova. As lições aprendidas com as revoluções tecnológicas anteriores, incluindo fertilização *in vitro*, organismos geneticamente modificados e clonagem, mostraram a necessidade de encontrar um equilíbrio entre a inovação industrial, redução de riscos e discussão pública sobre a regulamentação destas tecnologias. Isto se torna mais importante quando não está claro que os riscos potenciais da tecnologia possam ser qualificados e quantificados com a metodologia preconizada pela legislação vigente (BOWMAN; HODGE, 2006).

Nessa mesma linha de raciocínio, o crescimento acelerado da nanotecnologia, nos últimos anos, tem levado ao questionamento da sociedade científica sobre os métodos atuais para a análise e acompanhamento dos riscos desses novos materiais para a sociedade (BOWMAN; HODGE, 2006).

Levando-se em consideração FDA (*US Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), nota-se que as agências regulatórias vêm mostrando maior interesse em entender a adequação da regulamentação vigente para medicamentos, a fim de avaliar os possíveis riscos advindos dos nanomateriais. Essa preocupação é demonstrada na articulação de grupos de trabalho específicos para avaliar as necessidades dessa nova tecnologia, presença nos fóruns de discussão sobre o tema, investimento dos governos em pesquisas de toxicidade e benefícios desses materiais.

As agências reguladoras seguem, assim, trabalhando para compreender o quão efetiva é a regulamentação e seus testes toxicológicos, com o fito de avaliar os impactos da nanotecnologia para a saúde humana (FDA, 2010, 2011, 2012a, 2013; EMA, 2006, 2011, 2013b).

2.5.1 Estados Unidos da América (EUA)

O Comitê de Coordenação Política Interagência de Tecnologias Emergentes da Casa Branca (ETIPC) desenvolveu um conjunto de princípios específicos para a regulação e supervisão da aplicação da nanotecnologia, para orientar o desenvolvimento e a implementação de políticas ao nível da agência.

A Iniciativa Nacional em Nanotecnologia (National Nanotechnology Initiative - NNI) é gerida no âmbito do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (NSTC), através do qual o Presidente dos Estados Unidos coordena as políticas de ciência e tecnologia para todo o Governo Federal. A NNI é basicamente composta de oito programas: nanomateriais; processos e fenômenos em nanoescala; dispositivos e sistemas em nanoescala; instrumentação, metrologia e padrões para nanotecnologia; nanomanufatura; aquisição de instrumentação e centros de pesquisa; ambiente, saúde e segurança; dimensão educacional e social (NNI, 2014).

O subcomitê de Nanociência, Engenharia e Tecnologia (NSET) do Comitê do NSTC coordena o planejamento, orçamento, implementação do programa e avaliação dos progressos realizados pela iniciativa (NNI, 2014).

O subcomitê NSET é composto por representantes de agências participantes e do Escritório Executivo do Presidente. O Gabinete de Coordenação Nacional de Nanotecnologia (NNCO) atua como o ponto de contato primário para esclarecer informações sobre o NNI; fornece suporte técnico e administrativo ao NSET Subcomitê, incluindo a elaboração de planejamento múltiplas-agência, orçamento e documentos de avaliação; desenvolve, atualiza e mantém o site da NNI (<http://nano.gov>). O Grupo de Trabalho sobre os Impactos Ambientais e de Saúde da Nanotecnologia do NSET (NEHI) está encarregado de apoiar as atividades federais para proteger a saúde pública e o meio ambiente e foi o responsável pelo desenvolvimento da Estratégia da NNI de 2011 sobre Saúde Ambiental e Segurança (EHS). Este documento fornece orientação para as agências federais que produzem a informação científica para a gestão de riscos, tomada de decisão regulatória, uso de produtos, planejamento de pesquisas e divulgação pública sobre nanotecnologia. As principais áreas de pesquisa que fornecem estas informações críticas são: 1) infraestrutura de medição nanomaterial, 2) avaliação da exposição humana; 3) saúde humana; 4) ambiente; 5) métodos de avaliação de risco e gestão de risco e 6) informática e modelagem. Considerações sobre as

implicações éticas, legais e sociais (ELSI) da nanotecnologia também foram incluídas na estratégia (NNI, 2014).

Em 2011, o FDA publicou o seu primeiro ‘rascunho’ de um guia para a indústria sobre a avaliação e o uso de nanomateriais em produtos regulamentados. Este guia ainda está sendo revisado e aberto a comentários da população (FDA, 2011).

Além deste guia, foram publicados pela mesma entidade outros dois guias específicos para alimentos e cosméticos. Eles destacam os pontos detectados até hoje que seriam importantes a se considerar para a análise de toxicidade dos cosméticos e alimentos com base em nanomateriais (FDA, 2012a).

Importa destacar que o FDA trabalha em parceria com o governo federal dos EUA, a NNI e agências regulatórias internacionais, a fim de gerar dados necessários, assim como coordenar políticas para garantir a segurança e eficácia de produtos que utilizam nanomateriais (NNI, 2014).

Segundo informação publicada em sua página de internet, o FDA continuará a regulamentar produtos nanotecnológicos sob suas autoridades legais existentes, em conformidade com as normas legais específicas aplicáveis a cada tipo de produto sob a sua jurisdição. O FDA pretende garantir vias regulatórias transparentes e previsíveis fundamentadas no melhor conhecimento científico disponível (FDA, 2011).

2.5.1.1 Processo de aprovação de um novo medicamento nos Estados Unidos

De forma geral, o processo de aprovação de um novo medicamento nos Estados Unidos é dividido em 3 fases: pré-clínica, clínica e pós-comercialização (EIFLER; THAXTON, 2011).

Em geral, na fase pré-clínica, o FDA solicita, no mínimo, que os patrocinadores apresentem: (1) o plano de desenvolvimento do perfil farmacológico do fármaco, (2) determinar a toxicidade aguda do medicamento em pelo menos duas espécies de animais e (3) realizar estudos de toxicidade de curto prazo que variam de 2 semanas a 3 meses, dependendo da duração prevista da utilização do medicamento proposto nos estudos clínicos planejados (EIFLER; THAXTON, 2011).

Para atender às solicitações do FDA, durante o desenvolvimento pré-clínico do medicamento, o patrocinador deve avaliar os efeitos tóxicos e farmacológicos do

medicamento proposto através de testes *in vitro* e *in vivo* (animais de laboratório). A avaliação da genotoxicidade também deverá ser realizada, bem como investigações sobre a absorção, o metabolismo, a toxicidade de metabólitos e o *clearance* do fármaco e seus metabólitos.

Uma vez que esses dados estejam disponíveis, deve-se submeter ao FDA um dossiê (chamado IND – *Investigational New Drug Application*) solicitando a aprovação da continuidade do processo de desenvolvimento deste medicamento, i.e., o começo dos testes em humanos.

A regulamentação do FDA possui um amplo grau de flexibilidade com relação à quantidade de informação que necessita ser submetida no IND, mas, basicamente, as informações seriam:

- Informação sobre o plano de desenvolvimento clínico do medicamento.
- Informação sobre a parte química, a manufatura e controle de qualidade do medicamento.
- Informação sobre a farmacologia e toxicologia do medicamento.
- Se houver, experiência em humanos com o medicamento proposto ou composto relacionado.

Não há uma abordagem única ("one size fits all") que determine o planejamento dos estudos pré-clínicos para todos os medicamentos. Pelo contrário, o FDA ressalta que os estudos pré-clínicos devem ser adaptados tendo em vista cada produto sob investigação e seus ensaios clínicos propostos. Embora não se tenha um “pacote” padrão de testes definido, existem alguns guias disponíveis para orientação. Além disso, o FDA está aberto para discussão, em caráter de orientação, em qualquer etapa do processo, principalmente antes da submissão do plano de desenvolvimento do produto.

O objetivo da fase pré-clínica é desenvolver dados adequados para embasar a decisão de seguir ou não com o desenvolvimento do medicamento proposto para a fase clínica, estudos em humanos. Caso o medicamento obtenha essa aprovação, deve-se solicitar a aprovação do Comitê de Ética para os ensaios clínicos. Assim que obtida essa aprovação, os estudos clínicos serão realizados para avaliar a segurança e eficácia do tratamento sob investigação em uma doença ou condição de saúde específica.

Depois que os dados dos estudos clínicos são coletados, o patrocinador do medicamento solicita formalmente a aprovação do FDA para a sua comercialização através da submissão do NDA (*New Drug Application*). Esse processo visa fornecer informações suficientes para permitir que os revisores/avaliadores do FDA possam estabelecer: (1) a segurança e eficácia do medicamento em sua indicação proposta, quando utilizado conforme

as instruções e avaliar se os benefícios do tratamento superam os seus riscos, (2) se a bula proposta para o medicamento é apropriada, (3) os métodos de Boas Práticas de Fabricação propostos de forma a garantir a identidade, a potência, qualidade e pureza do medicamento.

2.5.2 União Europeia (UE)

Na UE os nanomateriais são regulamentados pela ECHA (*European Chemicals Agency*) através do REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), consolidado das regulamentações para o registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos na UE. O REACH entrou em vigor em 1º de junho de 2007. De acordo com a ECHA, os nanomateriais são abrangidos pela definição de "substância" química estabelecida pelo REACH. Sendo assim, toda a atual regulamentação estabelecida no REACH é considerada aplicável aos nanomateriais, mesmo que não haja referência explícita a esse termo na regulamentação.

As autoridades competentes da UE informam que avaliarão todas as submissões para colocar um produto com base em nanotecnologia no mercado, utilizando os princípios estabelecidos de análise risco/benefício, em vez de apenas com base na tecnologia *per se* (CHMP, 2006). Portanto, as autoridades europeias consideram que a avaliação e prevenção de riscos potenciais relacionados ao uso de qualquer medicamento estão previstas na atual legislação farmacêutica, de forma geral, sem que haja menção ao termo nanomedicamentos.

Outras atividades interessantes realizadas na UE, com base no relatório da EMA de 2006, foram as consultas sobre nanotoxicologia e nanoecotoxicologia, as mesas redondas promovidas pelo *European Group of Ethics in Science and New Technologies*, a solicitação de revisão e aplicabilidade das metodologias existentes para a avaliação dos potenciais riscos associados aos produtos baseados em nanotecnologia e, mais recentemente a criação do *Innovation Task Force* (ITF) (CHMP, 2006).

A criação de uma base de dados para arquivar e disponibilizar todos os dados que estão sendo gerados, referentes aos nanomateriais, foi de suma importância. Essa base de dados se chama NAPIRAhub, é uma plataforma de TI dedicada a gerenciar toda informação disponível para a avaliação da segurança/risco desses produtos. Essa base de dados arquiva toda informação de acordo com os guias OCDE e ISO, consegue monitorar as alterações

feitas nos documentos, possui potencial de busca bem extensivo, além de os dados serem compartilhados sem custo.

Muitas dessas atividades seguem em andamento e algumas conclusões já puderam ser reunidas. Dentre essas conclusões podem-se citar a de que ainda não se tem conhecimento e dados suficientes para a caracterização, detecção, quantificação e a destinação das nanopartículas em humanos, bem como no meio ambiente. Além disso, também não se tem informação sobre todos os aspectos que podem levar à intoxicação humana e ambiental para se definir de forma satisfatória como deve ser feita a avaliação desses riscos (CHMP, 2006).

Embora os métodos toxicológicos existentes hoje sejam capazes de identificar muitos dos riscos existentes para os diferentes produtos e processos utilizados pela nanotecnologia, não se sabe qualificar e quantificar os riscos que não estariam sendo avaliados. Por isso, acredita-se que as metodologias existentes precisam ser adaptadas e novos métodos desenvolvidos e incluídos.

Alguns produtos formulados com nanotecnologia já receberam autorização para serem comercializados na UE. Dentre esses produtos podem-se citar: lipossomas (e.g., Caelyx[®], Myocet[®]), conjugados de polímeros de proteínas (e.g., PegIntron[®], Somavert[®]), substâncias poliméricas (e.g., Copaxone[®]) e suspensões (e.g., Rapamune[®], Emend[®]) (CHMP, 2006).

No caso das empresas terem dúvidas sobre as necessidades regulatórias para a submissão de seus nanomedicamentos, é facultado à empresa consultar a EMA desde os estágios iniciais do desenvolvimento do produto para obter orientação (CHMP, 2006).

Quando houver mais experiência da avaliação dos registros solicitados, a ECHA deve emitir orientações mais específicas sobre o tratamento de nanomateriais, como formas semelhantes de uma substância ou como substâncias distintas, com o objetivo de permitir o compartilhamento adequado dos dados.

2.5.2.1 Processo de aprovação de um novo medicamento na União Europeia

Na Europa existem 4 processos diferentes para se obter a aprovação de um novo medicamento: Autorização Nacional, Procedimento Descentralizado, Procedimento de Reconhecimento Mútuo e o Processo Centralizado. Para efeito desse trabalho será descrito apenas o Processo Centralizado, pois é o processo utilizado para produtos oncológicos.

O Processo centralizado é utilizado para os produtos biológicos ou outros que façam uso de alta tecnologia; produtos para HIV, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, auto-imunes ou outras disfunções, doenças virais, produtos órfãos ou outro novo fármaco sob a solicitação do patrocinador. A aprovação de um produto através desse processo se aplica para todos os países da União Europeia.

O Processo Centralizado deve ser iniciado com antecedência de, no mínimo, sete meses antes da submissão do dossiê de solicitação de autorização de comercialização (*Marketing Authorization Application* - MAA) do produto. Nesse período o patrocinador deverá notificar à EMA a sua intenção de submeter o MAA e o mês previsto para submissão. Esse é considerado o processo de pré-submissão e requer uma série de informações como, por exemplo, o racional da utilização do processo centralizado. A EMA irá avaliar a solicitação e notificar o patrocinador sobre sua aceitação do MAA. Após o aceite, a EMA irá definir os revisores do processo. Os revisores são autoridades regulatórias de algum dos países membros da UE.

O dossiê de submissão possui 5 módulos. Esses módulos compilam toda a informação disponível sobre o produto desde as características dos produtos, bula, rótulo, avaliação de risco ambiental, descrição do sistema de farmacovigilância, plano de gerenciamento de risco, toda informação pré-clínica (farmacologia, farmacocinética, toxicologia), toda informação clínica (farmacologia clínica, eficácia, segurança, detalhamento dos estudos), referências, documentos legais etc.

Esse dossiê passa por um período de validação onde a EMA determina se necessita de informação adicional para conduzir a análise. Uma vez que o dossiê é considerado válido, é estabelecido o prazo para a revisão científica e emissão do parecer.

2.5.3 Brasil

O Ministério da Saúde (MS), no uso de sua atribuição específica, determina que todos os medicamentos, antes de sua comercialização no Brasil, devem possuir a inscrição prévia no órgão ou na entidade competente, para garantir o cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionado com a eficácia, segurança e qualidade destes produtos, para sua introdução no mercado e sua comercialização ou consumo (Decreto nº 3.961, de 10 de outubro de 2001).

À ANVISA, ligada ao MS por meio de Contrato de Gestão, é atribuída a competência legal para a concessão do registro de medicamentos, suas alterações, suspensão e cancelamento no Brasil (Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 e Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976).

Embora ainda não esteja estabelecida nenhuma regulamentação, por parte da ANVISA, específica para a revisão e aprovação de nanomedicamentos, tendo em vista o desenvolvimento da nanotecnologia no mundo, o governo brasileiro tem investido em um programa abrangente para o desenvolvimento da nanotecnologia em nível nacional. Esse programa, chamado de “Desenvolvimento da Micro e Nanotecnologias”, compunha o plano plurianual do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT, atualmente MCTI – Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação) para os anos de 2004-2007.

Em 2003, foi definido um grupo de trabalho responsável pela estruturação do que seria o Programa de Nanotecnologia, tal como supracitado. Esse grupo de trabalho, após a análise do panorama brasileiro em nanotecnologia e muitas discussões, foi responsável pela orientação do projeto quanto às ações necessárias para atender a demanda nacional nessa área.

Ainda em 2003, foi aprovado o Programa "Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia" (PPA 2004–2007), tendo por objetivo promover o desenvolvimento de novos produtos e processos em nanotecnologia. Nota-se, entretanto, que não há referência específica ao investimento para caracterização, principalmente toxicológica, dos materiais já conhecidos. Mas, evidentemente, não se pode negar que a intensificação dos investimentos nessas áreas (pesquisa básica e pesquisa cooperativa com as empresas), além de fortalecer as redes existentes e a infraestrutura laboratorial, contribui, também, para a geração de conhecimento e tecnologia para a posterior caracterização dos nanomateriais.

Em 2004, as ações apoiadas no PPA 2004-2007 passavam a considerar os aspectos éticos e os impactos sociais da NN (edital CNPq 013/2004, principalmente). Além disso, em outubro do mesmo ano, formou-se a Rede Renanosoma (Rede de Pesquisa em Nanotecnologia, Sociedade e Meio ambiente) (RENANOSOMA, 2014).

Em 2005, foi criado o Programa Nacional de Nanotecnologia, que tem por objetivo atender as demandas estratégicas identificadas pela comunidade envolvida com o desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia. Além disso, neste programa houve a junção das ações dos Fundos Setoriais às ações orçamentárias do PPA.

O PPA 2008-2011 previu ações voltadas para o fomento a projetos de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia, no âmbito do Ministério da Ciência e Tecnologia. Dentre elas pode-se citar: (1) Apoio a Redes de Nanotecnologia com recursos da ordem de R\$

14,8 milhões para o quadriênio; (2) Fomento a Projetos Institucionais de Pesquisa e Desenvolvimento em Nanociência e Nanotecnologia, com recursos de R\$ 406, 8 mil; (3) Fomento a Projetos de Pesquisa e Desenvolvimento em Nanotecnologia, com R\$ 20,7 milhões.

Com isso, pôde-se estabelecer: o Programa de Laboratórios Estratégicos e Regionais (focado principalmente no LNLS e INMETRO), o LabNano no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), como Laboratórios Regionais.

Neste mesmo ano, o Programa de Redes foi renomeado para Rede BrasilNano. As redes tornaram-se mais específicas, mas ainda não são suficientes para abordar todas as áreas de nanotecnologia no país.

Em abril de 2012, foi criado o SisNano por meio da portaria do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação N° 245. O SisNano consiste em um sistema de laboratórios direcionado à pesquisa, desenvolvimento e inovação em nanociências e nanotecnologias. De acordo com essa portaria, são objetivos do SisNano: estruturar a governabilidade para as nanotecnologias otimizando a infraestrutura, o desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada às atividades ligadas à inovação em nanoescala, além disso, servindo como suporte ao avanço acelerado do País na área estratégica de nanotecnologias. Adicionalmente, o SisNano também visa universalizar o acesso da comunidade científica, tecnológica e de inovação do país à infraestrutura e promover cooperação internacional com o Mercosul.

O SisNano é formado por duas categorias de laboratórios: Laboratórios Associados e Laboratórios Estratégicos. Os laboratórios estratégicos são totalmente financiados pelo MCTI e terão forte missão educacional. Os laboratórios associados integram conjuntos de sistemas e equipamentos em Nanociência e Nanotecnologia e são altamente especializados.

Uma das condições necessária para integrar o laboratório ao SisNano é disponibilizar, pelo menos, 15% do tempo dos equipamentos durante o horário de atividades a usuários externos à instituição.

A partir da criação do SisNano, o comitê consultivo em Nanotecnologia (CCNano), criado por meio da portaria N° 260, de 3 de maio 2011, tem por competência supervisionar as atividades do SisNano, analisar as propostas submetidas por instituições de pesquisa que queiram se integrar à rede SisNANO e recomendar ao MCTI novos Laboratórios Estratégicos, bem como o credenciamento dos Laboratórios Associados com base na proposta de adesão.

Em Agosto de 2013 foi lançada a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), pelo MCTI, com o objetivo de planejar e conduzir o conjunto de ações destinadas ao

desenvolvimento da nanotecnologia no país. Dentre suas funções, está a identificação e aproximação do potencial dos laboratórios e entidades de pesquisa das universidades das demandas da indústria. O programa será implantado com base no trabalho do Comitê Interministerial de Nanotecnologias, criado no início de julho, do qual fazem parte oito ministérios: o da Ciência Tecnologia e Inovação; da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; da Defesa; do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior; da Educação; do Meio Ambiente; de Minas e Energia e da Saúde. Estão previstos investimentos de, aproximadamente, R\$ 440 milhões para a IBN em 2013 e 2014.

Além disso, o Brasil faz parte de diversos acordos de cooperação internacional como, por exemplo: Cooperação Brasil-Canadá; Brasil-EUA; Brasil-China; Brasil-Comissão Europeia; Brasil-Portugal e Espanha.

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) dispõe de um laboratório de nanometrologia muito bem equipado. O laboratório possui as mais avançadas técnicas de caracterização microscópica, que vão da microscopia eletrônica de varredura em modo ambiental à microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução.

Além disso, vale ressaltar a estruturação do primeiro curso de graduação em Nanotecnologia no Brasil. É um curso de nível superior de 4 anos de duração, proposto por iniciativa de quatro unidades da UFRJ: Instituto de Física (IF), Escola Politécnica (Poli), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) e Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano (IMA). O curso está sendo oferecido desde 2010 (UFRJ, 2014).

Em 2013, foi estabelecido o Comitê Interno de Nanotecnologia, através da Portaria Nº 993/ANVISA de 10 de junho de 2013, com a finalidade de inserir a ANVISA no programa do desenvolvimento da Nanotecnologia para a saúde e sua regulação no Brasil. Esse comitê tem por finalidade elaborar um diagnóstico interno sobre a capacitação da Agência em nanotecnologia, fazer a triagem dos produtos submetidos à Agência com base em nanotecnologia, revisar as políticas estrangeiras sobre a regulamentação sanitária nessa área e propor políticas e diretrizes sobre a regulamentação brasileira dessa área no âmbito da agência.

Em 2014, através da Portaria 1.358, de 20 de Agosto, fica instituído o Comitê Interno de Nanotecnologia (CIN) no âmbito da ANVISA, seus integrantes e suas atribuições. Esse Comitê terá duração de 12 meses.

No Brasil, considera-se o desenvolvimento da nanotecnologia como uma área estratégica de extrema importância para manter a competitividade face ao mundo globalizado.

Acredita-se que essa tecnologia está sendo desenvolvida em ritmo acelerado no mundo, razão pela qual, caso não fossem realizados investimentos internos nesse setor, em pouco tempo o país poderia estar em uma situação delicada de posicionamento global em termos de produtos e serviços. Além disso, esse investimento é necessário para que o país esteja preparado para a substituição dos produtos e serviços que estarão obsoletos e que poderiam impactar a produção nacional e, por consequência, o desenvolvimento econômico do país.

2.5.3.1 Processo de aprovação de um novo medicamento no Brasil

O patrocinador, no ato da protocolização do pedido de registro de um produto como Medicamento Novo, deverá apresentar relatório técnico contendo as seguintes informações:

- A. Documentos legais da empresa, texto de bula, esboço do rótulo e embalagem propostos.
- B. Relatório de ensaios pré-clínicos: toxicidade aguda, sub-aguda e crônica, toxicidade reprodutiva, atividade mutagênica, potencial oncogênico.
- C. Relatório de ensaios clínicos para comprovar a eficácia terapêutica do novo medicamento (estudos de fase I, II, III). A ANVISA poderá solicitar a revisão dos dados dos estudos clínicos de fase III para averiguar se estes foram planejados, conduzidos e seus resultados analisados de forma confiável para a obtenção de significância estatística e clínico-epidemiológica.

Esse dossiê passará por um período de validação onde a ANVISA irá determinar se necessita de informação adicional para conduzir a análise.

Após a análise do dossiê e o deferimento do parecer, a empresa solicitante deverá apresentar seu certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) atualizado. Somente depois dessa etapa ocorrerá a publicação do número do registro do novo medicamento no Diário Oficial da União (DOU).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Comparar a abordagem regulatória da EMA, FDA e ANVISA com relação à avaliação de toxicidade para medicamentos convencionais e nanotecnológicos, identificando as possíveis deficiências dos testes requeridos e quando possível sugerindo procedimentos para sua melhoria, de forma a fortalecer os dossiês regulatórios dos nanomedicamentos.

3.2 Objetivos específicos

Sugerir, com base na literatura, possíveis adaptações dos testes toxicológicos pré-clínicos requeridos para os medicamentos nanotecnológicos, visando o fortalecimento do dossiê regulatório.

Comparar, no dossiê regulatório (EMA, FDA e ANVISA), os testes de toxicidade solicitados para a doxorrubicina convencional e para o DOXIL[®].

Analisar, através dos dados de farmacovigilância, o perfil de toxicidade do DOXIL[®] em comparação com a doxorrubicina convencional.

4. METODOLOGIA

Importa destacar que a presente obra utilizou por metodologia o levantamento bibliográfico. Nessa metodologia foi realizada a busca de toda informação publicada eletronicamente sobre o tema proposto. Não foi feita restrição ao período de publicação dos materiais, documentos e estudos clínicos.

Com relação ao levantamento bibliográfico, cabe ressaltar que o objetivo principal foi a análise qualitativa e não quantitativo do material e, por isso, não houve a preocupação com representatividade numérica, mas sim com o aprofundamento da compreensão do tema em epígrafe. Em muitos casos os critérios de inclusão e exclusão dos materiais só puderam ser definidos após a revisão de todo o material, de forma a evitar julgamentos.

Corroborando com a justificativa da metodologia utilizada está o fato da precariedade da linguagem documentária que proporcione uma recuperação de informação condizente com as necessidades informacionais desse trabalho. O baixo grau de especificidade da linguagem adotada pelo sistema de informação nessa área, eleva a dificuldade para a adequada indexação/recuperação da informação, ocasionando uma baixa precisão nos resultados obtidos através da abordagem quantitativa.

Isso posto, seguem abaixo (Quadro 1) as bases de dados utilizadas para essa pesquisa bibliográfica:

Quadro 1: Bases de dados utilizadas para o levantamento bibliográfico.

Base de Dados	Endereço eletrônico
SciELO	http://www.scielo.org/php/index.php
Scopus	http://www.scopus.com/home.url
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
EMBASE	https://www.embase.com/search/results
Cochrane	http://cochrane.bireme.br/cochrane/main.php?lang=pt&lib=COC
Capes	http://www.periodicos.capes.gov.br/
TrialTrove	http://gsk.citeline.com/account.asp?target=&ref=access
Clinicaltrials.gov	www.clinicaltrials.gov

Quando necessário, aos dados bibliográficos foram agregadas informações extraídas de endereços eletrônicos pertencentes a organizações governamentais e intergovernamentais,

que têm por praxe a divulgação de estudos, informativos e dados relacionados com as temáticas abordadas no presente trabalho (Quadro 2).

Quadro 2: Organizações Governamentais e Intergovernamentais.

Food and Drug Administration (FDA)
European Medicines Agency (EMA)
Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)
Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (MCTI)
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)
Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)

Os termos citados no quadro 3 foram utilizados como palavras-chave durante as buscas bibliográficas.

Quadro 3: Termos primários e secundários utilizados para o levantamento bibliográfico.

Termos Primários (Português/Inglês)	Termos Secundários (Português/Inglês)
Oncologia/Oncology	Testes toxicológicos, toxicologia/Toxicological analysis, toxicology
Nanotecnologia/Nanotechnology	Tolerabilidade/Tolerability
Nanomedicina/Nanomedicine	Estudos de fase IV/Phase IV studies
Nanopartículas/Nanoparticle	Evento adverso/Adverse event
Nanocarreadores/Nanocarries	Observacional/Observational
Nanodispositivos/Nanodevices	Aprovação regulatória, dossiê regulatório/Regulatory approval, regulatory dossier
Câncer/Cancer	OCDE/OECD

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os dados coletados, buscando-se traçar uma correlação entre as diferentes informações, identificando-se os pontos de maior relevância atualmente na aplicação da nanotecnologia no registro de medicamentos e esboçar uma proposta de sugestões para a contemplação na área regulatória voltada a medicamentos de base nanotecnológica.

Durante a pesquisa bibliográfica referente ao tema proposto ficou bastante evidente que ainda falta coordenação e unificação dos esforços dos países para se obter o desenvolvimento robusto de uma matéria que por natureza é transdisciplinar e de relevância transnacional e quanto maior a sua representatividade, maior será o reflexo dos seus resultados.

Isso posto, cabe discutir nesse trabalho o impacto do desenvolvimento científico para a regulamentação da nanomedicina, assim como comparar o que está sendo realizado em outros países com o intuito de aproveitar o que seja valioso para impulsionar o desenvolvimento dessa área no Brasil.

Com o objetivo de prover uma visão geral do panorama de desenvolvimento e ações nessa área entre Estados Unidos da América (EUA), Europa e Brasil foi criada a tabela abaixo (tabela 2) como uma introdução aos resultados que serão discutidos a seguir.

Tabela 2: Mapeamento dos processos e atividades voltadas para nanotecnologia nas agências reguladoras.

Processos e atividades	EUA (FDA)	UE (EMA)	Brasil (ANVISA)
Investimento financeiro para o desenvolvimento da nanotecnologia no país.	Sim	Sim	Sim
Regulamentações específicas para nanomedicamentos.	Não	Não	Não
Guias para orientação do setor regulado sobre a submissão de nanomateriais.	Sim	Sim	Não
Formulário específico para a declaração da presença de nanomateriais no medicamento acabado.	Sim	Sim	Não
Posicionamento sobre a aplicabilidade dos testes toxicológicos para nanomedicamentos disponível.	Sim	Sim	Não
Os investimentos federais são direcionados	Sim	Sim	Sim

Processos e atividades	EUA (FDA)	UE (EMA)	Brasil (ANVISA)
para a validação e aperfeiçoamento dos testes toxicológicos para nanomedicamentos.			
Laboratórios de metrologia estão adaptados à nanotecnologia.	Sim	Sim	Sim
Base de dados unificada disponível para armazenar informações sobre nanomateriais.	Sim	Sim	Não

Em face disso, sabe-se que existe muito mais do que a limitação científica para o sinergismo, ou falta dele, entre as nações para o desenvolvimento da nanomedicina e suas áreas afins. Dentre outros fatores que podem impactar esse desenvolvimento, pode-se citar a competição estratégica, econômica e política entre os países, tema que não foi abordado nesse trabalho, mas que é digno de citação (MILANOVIC; BUCALINA, 2013; NANOTECHNOLOGY NOW, 2008; MACOUBRIE, 2005; CALLAHAN, 2000; HUNT, 2006; SARGENT, 2008).

5.1 Análise do posicionamento das agências reguladoras em relação à necessidade de regulamentação específica para nanomedicamentos

Foram comparados os requerimentos regulatórios para a submissão de pedidos de registro de medicamentos nanotecnológicos às agências regulatórias dos Estados Unidos da América (FDA), da Europa (EMA) e do Brasil (ANVISA). Apesar do desenvolvimento da nanomedicina estar bem acelerado globalmente pode-se notar que as agências reguladoras estão adotando um critério conservador para a avaliação desses novos medicamentos. Conforme demonstrado ao longo desse trabalho, existem muitos fóruns de discussão em andamento, mas, até o presente momento, as agências acreditam que a informação disponível ainda não é suficiente para que sejam alterados os requerimentos regulatórios para a aprovação desses novos medicamentos.

Tanto o FDA como a EMA disponibilizam em suas páginas de *internet* seu posicionamento com relação à regulamentação dos nanomedicamentos. No caso do FDA, como primeiro passo para o entendimento da necessidade regulatória, pode-se citar a

divulgação do “*Draft Guidance: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology*” em 2011. Importante recordar que esse guia não tem natureza regulatória e nem objetivo de implantar definições nessa área, sendo utilizado principalmente para auxiliar a indústria e outros interessados a entenderem quando a formulação dos seus produtos pode impactar em seu registro, segurança, eficácia, assim como na saúde pública. No caso da EMA, desde 2011, houve a divulgação de quatro documentos (“*reflection papers*”), a saber: a) *Reflection paper on the development of block-copolymer-micelle medicinal products* (EMA/CHMP/13099/2013); b) *Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product* (EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02); c) *Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products* (EMA/325027/2013); d) *Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator product* (EMA/CHMP/SWP/100094/2011). Assim como o guia do FDA, esses documentos não têm caráter regulatório, somente educacional para a orientação da indústria e outros interessados.

Dessa forma, foi demonstrado que o FDA e a EMA estão seguindo basicamente o mesmo processo. Foram disponibilizados guias para consulta pública e, em paralelo, as agências capacitam-se para entender melhor a nova tecnologia, além de como e quando a regulamentação deverá ser revisada.

Ao passo que não foi implementada regulamentação específica para os nanomedicamentos, a regulamentação convencional está sendo utilizada para aprovação desses novos produtos. Entretanto, com o objetivo de capturar as necessidades dessa nova tecnologia e direcionar suas análises, as agências dos EUA e da Europa estão implementando uma maior abertura para que discussões sobre esses novos produtos sejam iniciadas desde o início do plano de desenvolvimento do nanomedicamento. Dessa forma, possibilita-se que os casos sejam acompanhados e avaliados de forma individual, concentrando-se na necessidade específica do produto em discussão, nos riscos para o paciente e para a sociedade de forma geral. Esse processo é justificado por essas agências sob o argumento de que ainda não existem informações disponíveis que justifiquem a padronização de procedimentos específicos para nanomedicamentos.

No que tange à regulamentação dessa nova tecnologia no Brasil, conforme mencionado anteriormente, somente em 2013, dez anos após o início das iniciativas do Governo Federal Brasileiro para estímulo e desenvolvimento da nanotecnologia, foi

estabelecido o Comitê Interno de Nanotecnologia da ANVISA. Iniciando, efetivamente, o processo de revisão da sua capacitação interna e necessidades com relação aos nanomedicamentos em 2013-2014, é de se esperar que esta comissão leve em consideração toda a experiência e informação publicada anteriormente pelas agências regulatórias internacionais, como FDA e EMA, e pelos grupos intergovernamentais de trabalho nessa área. Visa-se, dessa forma, agilizar o processo de estruturação da regulamentação brasileira para os nanomedicamentos e, também, assegurar o alinhamento com as propostas internacionais. Esse alinhamento é de extrema importância, como mencionado anteriormente, pois sem essa harmonização entre os países e os pesquisadores continuará existindo uma lacuna de conhecimento para o desenvolvimento de tecnologia que visa trazer tantos benefícios para a sociedade. Apesar dos temas que envolvem a nanotecnologia continuarem em debate, o que deve se manter por muitos anos à frente, seria sensato buscar alinhamento com os critérios que estão sendo considerados pela sociedade científica de forma geral e colaborar com o seu desenvolvimento e não se distanciar da discussão.

Embora seja tema de grande discussão, ainda não existe divulgação na página eletrônica da ANVISA sobre seu posicionamento com relação à necessidade de adequação da regulamentação aos nanomedicamentos. Porém, pode-se notar que a sociedade busca direcionamento sobre essa discussão. A preocupação com o tema é notória quando se analisa os Projetos de Leis submetidos pelos deputados e senadores para apreciação do governo (quadro 4). Esses projetos são criados levando-se em consideração as necessidades apontadas pela população, já que esses profissionais, por definição, representam a “voz do povo”.

Quadro 4: Projetos de Lei Submetidos por deputados e senadores sobre nanotecnologia.

Projeto	Assunto	Situação
PL 6741/2013 (11/11/2013)	Dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país e dá outras providências.	Aguardando parecer do relator da Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (CMADS).
PL 5133/2013 (13/03/2013)	Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia.	Aguardando parecer do relator da Comissão de Desenvolvimento Econômico, Indústria e Comércio (CDEIC).
PL 5076/2005 (18/04/2005)	Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País, cria a Comissão	PL rejeitado e arquivado.

Projeto	Assunto	Situação
	Técnica Nacional de Nanossegu ran ça - CTNano, institui o Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia - FDNano e dá outras providências.	
PL 131/2010 (12/05/2010)	Altera o Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que institui normas básicas sobre alimentos e a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos e dá outras providências, para determinar que rótulos, embalagens, etiquetas, bulas e materiais publicitários de produtos elaborados com recurso à nanotecnologia contenham informação sobre esse fato.	PL rejeitado.

Fonte: BRASIL, 2005; 2010; 2013a; 2013b.

Esses Projetos de Lei têm como objeto a regulamentação da pesquisa e do desenvolvimento de produtos com base em nanotecnologia, assim como a rotulagem desses produtos, visando aumentar o esclarecimento à população sobre o produto a que será exposta. Citando especificamente o Projeto de Lei (PL) nº 5.076, de 2005, este foi rejeitado sob a conclusão de que a legislação vigente brasileira já estaria cobrindo os tópicos abordados no mesmo, principalmente na área da saúde, fazendo menção à Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Deve-se considerar que a referida Lei cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define a estrutura organizacional da autarquia e suas competências, mas não versa sobre a regulamentação da nanotecnologia no Brasil (BRASIL, 2005; 2010; 2013a; 2013b). Deve-se considerar, todavia, que a criação de uma agência não deve necessariamente prever todas as possíveis inovações a surgirem durante sua existência. Logo, a criação da ANVISA dava a tal autarquia o direito e o poder de regulamentar novos tipos de produtos à medida em que os mesmos fossem apresentados pelo setor industrial. Desta forma, ainda que a nanotecnologia não estivesse explicitamente citada e referida no bojo da Lei de criação da ANVISA, a Agência tem fundamentação legal para exercer sua prerrogativa de legislar sobre novas tecnologias, o que cabe no caso dos produtos de base nanotecnológica.

Além da referência à Lei 9.782, o parecer desfavorável ao PL 5.076 também cita a Lei nº 11.105, de 24 de Março de 2005 (Lei de Biossegurança). Essa Lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos

geneticamente modificados (OGM) e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e, portanto, a referida Lei não abrange os produtos nanotecnológicos.

Com o mesmo objetivo, durante debate na Comissão de Desenvolvimento Econômico, Indústria e Comércio da Câmara dos Deputados, a representante da Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), Cleila Guimarães Pimenta, ponderou sobre a necessidade da rotulagem específica para produtos nanotecnológicos: *“O que quer dizer um símbolo de nanopartículas para o consumidor? Um risco, um benefício? A tendência é confundir-lo ainda mais”* – defendendo o argumento de que não seria necessária regulamentação sobre o tema, enquanto não se tenha mais informação sobre a tecnologia (AGÊNCIA GESTÃO CT&I, 2013). Entretanto, deveria ser levado em consideração que a rotulagem adequada não é um critério somente de avaliação de “risco ou benefício”, mas sim um direito do consumidor à informação e escolha. O acesso à informação estimula a busca por conhecimento – o que deveria ser muito valorizado, ressaltando-se que a falta de informação induz a população à alienação. O tema, entretanto, ainda é tema de debate em todo o mundo, ainda que alguns países (europeus) já tenham adotado o critério de informar quando algum insumo nanotecnológico está presente no produto, mesmo sem identificar tal produto com algum símbolo específico; dessa forma, garante-se o acesso à informação sem, no entanto, estabelecer um novo artifício cuja representação ainda seria limitada em termos de conteúdo informacional à população, pouco versada em assuntos ligados à nanotecnologia.

Contudo, deve-se considerar que, talvez, o formato em que o disciplinamento dessa matéria deva ser implementado não seja através de uma Lei, assim como mencionado no parecer de rejeição do PL 131/2010, pois essa matéria é de competência normativa da ANVISA, conforme esclarecido pela Lei 9.782, ou com o conteúdo atual do projeto. Diz-se, dado não publicado, que o teor desses Projetos de Lei tem sido duramente criticado pelos órgãos competentes no Brasil, porém, além de não publicado o conteúdo dessas críticas não se implementou nenhuma ação concreta desde pelo menos 2005, quando foi submetido o primeiro PL mencionado acima. Será que 9 anos não foram suficientes para que essas críticas pudessem ser divulgadas oficialmente? Dessa forma, tendo em base a existência desses debates e projetos, espera-se que haja algum pronunciamento do referido órgão regulamentador, seja por forma de melhoramentos em suas ferramentas regulatórias ou, como já implementado por FDA e EMA, através de guias para orientação dos interessados sobre o assunto (indústria, pesquisadores, população etc.). Mais do que regulamentação burocrática, espera-se que se possa manter uma relação de confiança e credibilidade entre a população e

suas instituições. Essa credibilidade é importante para que a população sintasse-se segura e amparada. No entanto, a falta de informação sobre o posicionamento e ações da agência resulta em sentimento de insegurança, inclusive jurídica.

Em resumo, vivencia-se um sistema de revisão de dossiês de registro e aprovação de medicamentos que é escolhido por conveniência, seja ela política, econômica, ou até mesmo social. Embora muitas vezes deva-se levar em consideração essas outras influências, a preocupação com a saúde da população deve ser sempre o âmago das discussões. Apesar de atualmente a aprovação dos nanomedicamentos estar seguindo o processo convencional de aprovação de medicamentos novos, o que poderia parecer um grande alinhamento de sistemas de avaliação, isso não é verdade, pois os princípios que norteiam essas escolhas não são os mesmos. O que se pode discutir de forma bem objetiva e clara, pois o que se pretende é um sistema regido por dois princípios antagônicos por definição. O primeiro sistema, a revisão e aprovação de medicamentos convencionais, é regido pelo princípio “culpado até que se prove o contrário” (princípio da precaução), isto é, um medicamento não pode ser comercializado sem que antes sua relação risco-benefício tenha sido estabelecida através de testes comprovados e validados para tal finalidade. Já no segundo sistema que se implementa, passiva ou ativamente, ao utilizar-se o sistema de avaliação convencional para nanomedicamentos, é o princípio do “inocente até que se comprove o contrário”, pois, conforme dados publicados, os testes utilizados para a avaliação de medicamentos convencionais não estão todos validados para os nanomateriais. Como será revisado abaixo, muitos desses testes estão sendo revisados para entender sua aplicabilidade para a avaliação dos nanomateriais, porém essa é uma atividade que está em andamento e, enquanto isso, novos nanomedicamentos estão sendo analisados e aprovados pelas agências regulatórias com base em testes que não são validados para a análise da relação risco-benefício e, portanto, sem a preconizada informação essencial para sua aprovação.

5.2 Guias para a avaliação toxicológica dos nanomedicamentos

Após análise dos testes pré-clínicos recomendados por FDA e EMA, pode-se notar que as agências utilizam uma abordagem bem flexível, possibilitando a escolha dos testes de acordo com as características do medicamento a ser testado e do seu plano de desenvolvimento clínico. As agências mencionadas acima baseiam-se nos guias ICH (Quadro

5), que levam em consideração as recomendações da OCDE e dos grupos de trabalho internacionais relacionados ao tema. Essas agências deixam claro que seus guias são somente recomendações, mas que caso seja necessário adotar outros testes que sejam tecnicamente mais viáveis, desde que seja apresentado racional satisfatório para a substituição, serão aceitos para avaliação. Vale ressaltar que esses guias não são específicos para nanomedicamentos, entretanto, existem grupos de trabalho avaliando sua aplicabilidade nessa área, assunto que será discutido no próximo item.

Quadro 5: Guias ICH relacionados com avaliação toxicológica para medicamentos.

Guias ICH
<i>S1: Regulatory notice on changes to core guideline on rodent carcinogenicity testing of pharmaceuticals.</i>
<i>S1A: The need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals.</i>
<i>S1B: Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals.</i>
<i>S1C (R2): Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals.</i>
<i>S2 (R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use.</i>
<i>S3A: Toxicokinetics: Guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies.</i>
<i>S3B: Pharmacokinetics: Guidance for repeated-dose tissue-distribution studies.</i>
<i>S4: Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non-rodent toxicity testing).</i>
<i>S5 (R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility.</i>
<i>S6 (R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.</i>
<i>S8: Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals.</i>

No Brasil foi elaborado um guia para medicamentos em geral (também não é específico para nanomedicamento) que é baseado nas mesmas diretrizes e agências citadas acima (ICH, OCDE, FDA e EMA) - *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos* (ANVISA, 2013). Esse guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos, não tem caráter regulatório e é flexível com relação à inclusão de outros testes, que não estejam listados nesse documento, desde que sejam testes validados e aceitos internacionalmente. Esse guia abrange as seguintes

áreas: estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME).

Apesar dos testes mencionados anteriormente serem amplamente utilizados para a avaliação de medicamentos convencionais e terem demonstrado seu valor para a correlação do perfil toxicológico do medicamento convencional nos testes pré-clínicos e na prática clínica, pode-se notar, em base às informações disponíveis atualmente, que essa correlação não é necessariamente verdadeira quando se analisa nanomedicamentos. Portanto, verifica-se a necessidade de avaliar a aplicabilidade desses testes para os nanomedicamentos.

5.3 Revisão dos testes toxicológicos requeridos pelas agências regulatórias e sua aplicabilidade e limitações para a avaliação dos nanomedicamentos

Apesar do posicionamento conservador das agências reguladoras sobre a instituição de regulamentação específica para nanomedicamentos, pode-se notar, nos últimos anos, certa abertura para a avaliação e adaptação de itens de sua regulamentação de forma a permitir que os nanomedicamentos possam ser avaliados de forma mais efetiva. Dentre esses itens estão os testes toxicológicos requeridos nos guias citados acima.

Como um dos focos do grupo de trabalho *Working Party on Manufactured Nanomaterials* (WPMN), estabelecido em 2006, está a revisão dos testes toxicológicos preconizados nas diretrizes OCDE (tabela 3), tendo em vista as necessidades emergentes advindas da nanotecnologia. O objetivo desse projeto é identificar a necessidade de novas diretrizes, assim como pontos de melhorias e inadequação das existentes para a avaliação de nanomateriais.

Tabela 3: Diretrizes da OCDE para teste de produtos químicos.

Número do teste	Título	Parecer
420	<i>Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure</i>	Adequado
423	<i>Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method</i>	Adequado
425	<i>Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure</i>	Adequado
403	<i>Acute Inhalation Toxicity</i>	Adequado
402	<i>Acute Dermal Toxicity</i>	Inadequado
430	<i>In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)</i>	Adequado
431	<i>In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test</i>	Adequado
435	<i>In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion</i>	Adequado
404	<i>Acute Dermal Irritation/Corrosion</i>	Adequado
405	<i>Acute Eye Irritation/Corrosion</i>	Adequado
429	<i>Skin Sensitisation</i>	Adequado
406	<i>Skin Sensitisation</i>	Adequado
407	<i>Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents</i>	Adequado
409	<i>Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents</i>	Adequado
412	<i>Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study</i>	Inadequado
413	<i>Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study</i>	Inadequado
471	<i>Bacterial Reverse Mutation Test</i>	Adequado**
473	<i>In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test</i>	Adequado**
476	<i>In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test</i>	Adequado
474	<i>Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test</i>	Adequado
475	<i>Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test</i>	Adequado
486	<i>Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo</i>	Adequado*
421	<i>Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test</i>	Adequado*
422	<i>Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test</i>	Adequado*
415	<i>One-Generation Reproduction Toxicity Study</i>	Adequado**
416	<i>Two-Generation Reproduction Toxicity</i>	Adequado**
414	<i>Prenatal Development Toxicity Study</i>	Adequado**

*Exceto para análise do trato respiratório como órgão-alvo. ** somente para via oral. Fonte: OECD, 2009.

Após sua análise, a OCDE considera que parte de suas diretrizes em vigor são aplicáveis aos nanomateriais. Em alguns casos são necessários ajustes à metodologia, em outros foi observado que será necessário o desenvolvimento de nova metodologia, pois as diretrizes disponíveis são inadequadas. Essas inadequações estão, principalmente, relacionadas à falta de padronização e validação de métodos de análise qualitativos e quantitativos para nanomateriais (OECD, 2009). Segue abaixo a análise do WPMN para os testes preconizados pela OCDE.

O WPMN, após revisão dos critérios de cada teste OCDE indicado para avaliação da toxicidade aguda, informou serem apropriados os testes 420, 423, 425 para análise inicial da toxicidade de nanomateriais, levando-se em consideração que a avaliação da extensão da toxicidade na lesão observada na autópsia é limitada. O teste 403, considerando-se o exame detalhado do trato respiratório, incluindo lavagem bronco-alveolar e critérios de avaliação da proliferação das células pulmonares, pode ser considerado apropriado para exposição inalatória aos nanomateriais. Porém deve-se levar em consideração a informação disponível nos procedimentos do teste onde é mencionado que o teste 403 não é destinado especificamente para a avaliação de nanomateriais. O teste 402, de exposição cutânea, por possuir critérios de análise patológica muito restritos e mínimos, não é considerado adequado para a análise de nanomateriais. Os testes 420, 423, 425 e 402 não fazem referência aos nanomateriais.

Com relação à avaliação *in vitro* da corrosão cutânea, o WPMN considera que os testes 430, 431, 435, podem ser aplicáveis aos nanomateriais, mas ressalta a importância de se avaliar as possíveis interações dos nanomateriais em análise com os componentes do teste de viabilidade celular utilizando MTT (ou outro corante vital que necessite conversão metabólica). Essas interações podem impossibilitar esse teste para a avaliação de nanomateriais, devido à inativação do marcador utilizado no teste. Os testes 404 e 405, irritação ocular e cutânea, foram considerados apropriados para avaliar a irritação induzida pelos nanomateriais.

De acordo com o relatório do WPMN, o Teste do Linfonodo Local, teste 429, foi considerado o método mais adequado para a investigação de potencial de sensibilização cutânea dos nanomateriais. As vantagens desse método incluem o bem-estar dos animais de laboratório, a objetividade dos desfechos utilizados (*endpoints*) e menor utilização de animais do que o teste nº 406 e permite estimar a potência da reação de sensibilização induzida pela amostra-teste. Ainda nesse sentido, esse teste usa menos amostra-teste, o que pode ser uma

vantagem quando se analisam nanomateriais, mas o teste não faz referência aos nanomateriais.

Os testes 407 (28 dias) e 409 (90 dias) foram considerados apropriados pelo WPMN para investigar a toxicidade de doses repetidas de nanomateriais por via oral, devendo-se levar em consideração a baixa capacidade desse método para detectar os efeitos adversos, que são uma preocupação particular com algumas nanopartículas (por exemplo, efeitos cardiovasculares). De acordo com esse grupo, esses testes foram atualizados ao longo do tempo para melhorar a capacidade de avaliação de efeitos neurotóxicos, imunotóxicos e efeitos ao aparelho reprodutivo. O teste nº 407 foi adaptado para incluir também os efeitos no sistema endócrino, sendo de grande importância a consideração das informações disponíveis sobre os efeitos adversos do material em estudo, para adequar a metodologia de análise às especificidades do material analisado. Entretanto esses testes não fazem referência à utilização de nanomateriais.

Os testes nº412 e nº 413 ainda não foram revisados para melhorar a capacidade de detecção de efeitos neurotóxicos e imunotóxicos e, por isso, não devem ser utilizados para a avaliação de nanomateriais (ao menos, por enquanto). São, ainda, muito limitados para análise patológica. Ambos os testes possuem a informação no seu texto informando que não são destinados especificamente para a avaliação de nanomateriais.

Os testes 471, 473 e 476 foram considerados apropriados, pelo WPMN, para a avaliação inicial do potencial mutagênico dos nanomateriais. Porém, deve-se levar em consideração que o uso de partículas insolúveis nesses testes pode levar a resultados falsos. De acordo com o WPMN, a realização destes 3 testes para cada produto testado minimizaria os riscos de resultados falsos, além da realização dos testes complementares 474, 475 ou 486, *in vivo*, para a validação dos resultados positivos dos testes *in vitro*, mas, para isso, seria necessária a avaliação correta dos órgãos-alvo do produto químico. Sendo o fígado ou medula óssea, os testes *in vivo* mencionados acima aplicar-se-iam. Mas, se for o trato respiratório após inalação, ainda não existe teste OCDE para essa finalidade. Cabe ressaltar que nenhum dos testes mencionados faz referência a avaliação de nanomateriais.

De acordo com a revisão do WPMN os testes que avaliam a toxicidade reprodutiva dos produtos químicos, testes 421, 422, 415, 416 e 414, podem ser aplicados para a análise da toxicidade de nanomateriais por exposição via oral. Entretanto, a toxicidade advinda da exposição por outras vias não pode ser investigada por esses testes. Sendo necessário o desenvolvimento de novos testes para essa finalidade. Os referidos testes não fazem menção a possível avaliação de nanomateriais.

Além dos desfechos avaliados pelos testes da OCDE, no *workshop* realizado pelo *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* (ECETOC), em 2005, foram discutidas as estratégias complementares para estabelecer a segurança dos nanomateriais. Dentre essas estratégias pode-se citar a importância da avaliação do estresse oxidativo para a adequada caracterização dos nanomateriais (e.g. por Ressonância Paramagnética Eletrônica); da avaliação da translocação das NPs pelas membranas do organismo; da utilização de tecidos cardíacos e cerebral para analisar os efeitos das NPs especificamente nesses órgãos; do uso do teste do cometa para a avaliação de genotoxicidade das NPs (WARHEIT *et al.*, 2007).

Além da revisão realizada pelo WPMN, vale ressaltar os estudos de Nel e colaboradores (2006) e Jones e Grainger (2009), pelos quais pode-se resumir alguns pontos críticos que influenciam a análise dos resultados dos testes toxicológicos *in vitro*, como será realizado nos itens abaixo.

5.3.1. Caracterização adequada do nanomaterial utilizado no estudo

Apesar de se saber que os nanomateriais exibem características diferenciadas por causa do seu tamanho diminuto, ainda não há clareza quanto à relação entre esses efeitos e suas características toxicológicas. Além disso, deve-se levar em consideração que o termo “nanomaterial” faz referência a uma variedade de materiais com características totalmente distintas, o que aumenta a complexidade para garantir sua adequada caracterização. Portanto, faz-se necessária a padronização das características que devem ser avaliadas em todos os nanomateriais para que se possa, ao longo do tempo, correlacionar os resultados toxicológicos obtidos nos testes, *in vitro* e *in vivo*, com as características de cada material. Essa correlação vai possibilitar futuramente um melhor direcionamento analítico para cada tipo de material. Dentre as características a serem analisadas pode-se citar: tamanho da partícula; tamanho do agregado e/ou aglomerado formado, distribuição de tamanho na formulação; área, química e carga superficial; potencial *zeta*; estrutura/formato; estabilidade da formulação; solubilidade; reatividade de superfície; pureza; porosidade, dentre outras características (SAYES, WARHEIT, 2009; BERHANU *et al.*, 2009; WARHEIT, 2008; POWERS *et al.*, 2007).

5.3.2. Padronização na metodologia utilizada para quantificar a dose administrada

Dentre as discussões mais importantes sobre os nanomedicamentos está o estabelecimento do critério de avaliação de sua dose. Apesar de utilizada por muitos dos estudos publicados, a massa pode não ser a medida mais adequada para a avaliação da exposição em relação aos efeitos sobre a saúde do paciente. Levando-se em consideração que ainda existe um “vácuo” de conhecimento para que se possa afirmar qual seria a melhor alternativa, podem-se discutir algumas propostas disponíveis na literatura, mas sem a esperança de se chegar a um resultado único e universal, pelo menos a curto prazo.

A dose expressa em massa/volume tem a vantagem de ser mais fácil de quantificar. Porém, isso não lhe garante relevância para a correlação dose-resposta que se pretende analisar, pois deve-se considerar que os nanomateriais são considerados “diferentes” dos materiais em macroescala, dentre outras razões, por causa da sua elevada relação superfície/volume. Além disso, considerando-se os resultados dos estudos toxicológicos que demonstram maior toxicidade dos nanomateriais quando comparados ao material em macroescala utilizando-se a mesma dose em relação à massa/volume, fica evidente a necessidade de uma exploração mais profunda sobre qual seria a relevância dessa medida em relação à resposta observada (DUFFIN *et al.*, 2007, LANDSIEDEL *et al.*, 2010, OBERDORSTER *et al.*, 2005, SINGH; NALWA, 2007). Alguns pesquisadores, como Wittmaack (2007), consideram a relação número de partículas/volume a mais relevante em seus estudos, mas outros, como Oberdörster (2005), demonstram que a medida que teria melhor correlação dose-resposta seria a área superficial/volume, pois como se sabe a resposta toxicológica depende das propriedades de superfície do nanomaterial e que a área superficial aumenta exponencialmente com a diminuição do tamanho da nanopartícula. Sendo assim, como ainda não existe um consenso sobre o critério que se deve utilizar, talvez seja necessário levar em consideração que provavelmente diferentes nanomateriais necessitarão de diferentes critérios e, por isso, é tão importante investir em estudos nessa área.

5.3.3. Padronização dos testes *in vitro* para análise toxicológica

As monoculturas de células são amplamente utilizadas para avaliação toxicológica de materiais, sendo os resultados desses testes considerados como indicador de biocompatibilidade do material testado. Entretanto, sabe-se que os vários tipos celulares, suas diferenciações e localização são essenciais para a formação e função dos órgãos e tecidos humanos. Além disso, como observado anteriormente sobre a patogenia do câncer, as interações intercelulares e com a ME são de extrema importância para a formação e caracterização do câncer, influenciando de forma importante na sua fisiopatologia. Sendo assim, pode-se assumir que um dos fatores da elevada discrepância entre os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* poderia ser a utilização de monoculturas de células para “mimetizar” o organismo *in vivo*. Deveria ser enfatizada a importância das co-culturas para se obter uma melhor correlação entre os dados gerados nos testes *in vitro* e os resultados obtidos nos testes *in vivo* para os diferentes nanomateriais testados (JONES; GRAINGER, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; UNGER *et al.*, 2011).

O êxito dos testes *in vitro* também está relacionado com a escolha do tipo de cultura e linhagens celulares que serão utilizadas para a avaliação dos diversos critérios toxicológicos. A escolha da célula a ser utilizada deve estar relacionada ao órgão-alvo e à aplicação do nanomaterial *in vivo*, pois devem ser representativas das condições naturais de um organismo e da enfermidade estudada. Dentre os tipos de cultura pode-se citar as primárias, secundárias e contínuas (imortalizadas) (JONES; GRAINGER, 2009).

A utilização de células primárias, apesar da dificuldade de obtenção, manuseio e manutenção, tem sido considerada com alternativa para obter-se uma melhor correlação entre os dados *in vitro* e *in vivo*, dentre outras explicações, por manter melhor correlação metabólica, apoptótica, fenotípica e proliferativa com o modelo *in vivo*. Mas deve-se considerar a variabilidade lote a lote das células primárias, que pode dificultar a reprodutibilidade dos testes. As culturas secundárias mantêm correlação com a cultura primária, porém sofrem outras alterações genéticas que permitem um maior número de passagens. Entretanto, quando se utiliza culturas secundárias deve-se levar em consideração o aumento de sua atividade metabólica comparada à da cultura primária. No caso das células contínuas ou imortalizadas (*long-lived cell lines*), deve-se considerar suas diferenças com relação ao número de cromossomos e a atividade metabólica dessas células frente às primárias e secundárias. Essas células são cultivadas por longos períodos e passam por extensiva

manipulação. Isso acaba gerando alterações intencionais e não-intencionais no fenótipo dessas células, reduzindo sua estabilidade (homeostase, potencial de crescimento, resposta biológica, sinalização etc.) e, por consequência, diminuindo sua semelhança com o tecido original, o que pode levar a dificuldade de correlação entre os estudos *in vitro* e *in vivo* (JONES; GRAINGER, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A utilização de diferentes linhagens de células de câncer é bastante comum por sua disponibilidade, custo e facilidade de cultivo, porém deve-se levar em consideração que essas células apresentam atividades metabólica, apoptótica e proliferativa diferenciadas, conforme analisado anteriormente na patogenia do câncer. A escolha da linhagem celular deve ser baseada em um racional muito bem elaborado para demonstrar que a linhagem celular escolhida é a mais adequada para avaliar os critérios toxicológicos necessários para o material em estudo. Por isso, deve-se mencionar a importância da avaliação das diferenças e similaridades entre os diversos tecidos do organismo e dos modelos *in vitro*. Um exemplo dessas diferenças é o tecido epitelial que possui características bem específicas dependendo da sua localização (cutâneo, oral, gástrico, pulmonar, nasal, renal, vaginal etc). Outro exemplo seria o endotélio que também varia suas características com sua localização (artéria aorta, barreira hematoencefálica, capilares pulmonares etc). O modelo celular escolhido deve possuir características específicas para avaliar os desfechos esperados, isto é, considerar qual tipo de epitélio será exposto ao nanomaterial durante o tratamento e escolher o modelo que tenha características semelhantes (incluindo a presença de secreções, quando for o caso) (JONES; GRAINGER, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outro aspecto importante a ser discutido sobre a padronização dos testes toxicológicos é a vantagem da utilização de culturas de células tridimensionais (3D) ao invés de bidimensionais (2D). De acordo com Jones e Grainger, 2009, as monoculturas de células 2D não seriam representativas do ambiente *in vivo*. Dentre os argumentos estão a falta de interação espacial entre as células e da interação entre diferentes tipos celulares com fenótipos variados. As discussões sobre esse tópico baseiam-se, principalmente, na perda da arquitetura tridimensional. A arquitetura 3D possibilita a manutenção de um ambiente mais semelhante ao ambiente *in vivo* (figura 6) do que as culturas 2D. Esse argumento baseia-se na influência que a pressão entre as células pode gerar na comunicação célula-célula e célula-ME, pois, como se sabe, várias atividades celulares estão relacionadas com essa comunicação, como, por exemplo, a migração, invasão, proliferação, apoptose e diferenciação celular. Outra vantagem importante, que é um limitante na cultura 2D, é a sobrevivência aumentada das

células em cultura 3D, possibilitando experimentos mais prolongados (HACKENBERG *et al.*, 2011).

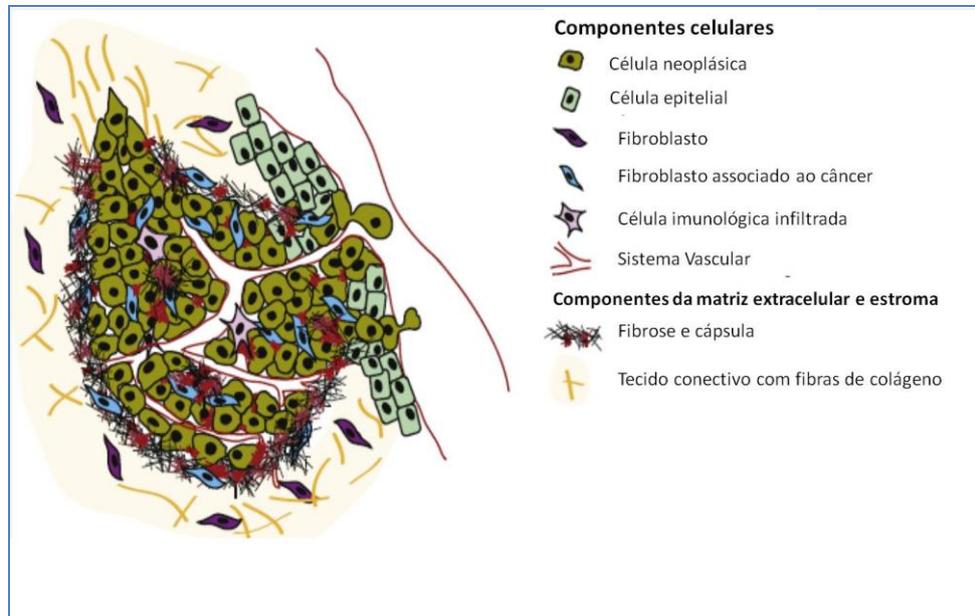


Figura 6: Representação da estrutura tridimensional do microambiente tumoral. Fonte: Thoma *et al.*, 2014.

Em relação à maior correlação *in vitro/in vivo*, além da questão estrutural *per se*, deve-se levar em consideração que essa estrutura influencia na captação dos nanomateriais. As culturas 3D produzem uma ME mais complexa e densa e suas células estão distribuídas de forma não homogênea, o que é traduzido em maior desafio para o transporte e captação dos nanomateriais pelas células mais profundas em relação às mais superficiais da cultura. Além disso, essa variação no poder de penetração dos nanomateriais também está relacionada ao tamanho do nanomaterial e ao tempo em que as células ficam expostas ao mesmo. Esse fato foi observado, principalmente, com o advento das culturas de células 3D, uma vez que em cultura de células 2D não foi demonstrada diferenciação no poder de penetração das NPs, as quais, mesmo com diferentes tamanhos, distribuíram-se homogeneamente nas células. No estudo de Huang e colaboradores foi demonstrado que em cultura de células 3D houve um aumento significativo na captação de NPs menores (2 e 6 nm) com o aumento do período de incubação de 3 para 24 h, o que não foi observado para a NP maior (15 nm). Esses dados demonstraram que, em geral, a toxicidade induzida pelas NPs foi menor na cultura 3D do que na cultura 2D (HUANG *et al.*, 2012; MITRA *et al.*, 2012; GODUGU *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar ainda, a importância da padronização da metodologia de preparo das amostras para análise, assim como a adequada operação dos equipamentos, sendo necessário garantir o treinamento constante dos profissionais envolvidos nessas análises (SCHULZE *et al.*, 2008).

5.3.4. Interações entre os nanomateriais e os testes toxicológicos

Conforme mencionado anteriormente, outro item importante que deve ser levado em consideração com relação à aplicabilidade dos testes toxicológicos para nanomedicamentos é a possível interferência dos nanomateriais com os componentes e nos procedimentos dos testes. Essa interferência pode levar a falta de consistência e/ou imprecisão nos resultados observados, o que dificulta a análise e tomada de decisão dos reguladores para estabelecer diretrizes e procedimentos para os nanomedicamentos. Algumas dessas interações estão demonstradas na tabela 4.

Tabela 4: Possíveis interferências entre os nanomateriais e os testes toxicológicos.

Nanomaterial	Interação	Mecanismo (Propostas)	Referências
Nanotubo de carbono	Corantes/marcadores utilizados nos testes de citotoxicidade como: MTT, WST-1, CBB (<i>Coomassie Brilliant Blue</i>), Alamar Blue e Vermelho neutro.	Os nanotubos ligam-se aos cristais de formazam, estabilizando sua estrutura e impedindo sua solubilização. Os NTs quebram o anel tetrazólio do corante, levando a resultado falso-positivo.	MONTEIRO-RIVIERE, INMAN, 2006; CASEY <i>et al.</i> , 2008; MONTEIRO-RIVIERE <i>et al.</i> , 2009; WORLE-KNIRSCH <i>et al.</i> , 2006; CASEY <i>et al.</i> , 2008; GUO <i>et al.</i> , 2008
	Nutrientes essenciais do meio de cultura.	Adsorvem os nutrientes do meio de cultura levando a resultados falso positivos.	KROLL <i>et al.</i> , 2012
	Propriedade do nanomaterial.	Interferência ótica. Capacidade de absorver luz no mesmo	KROLL <i>et al.</i> , 2012

Nanomaterial	Interação	Mecanismo (Propostas)	Referências
		comprimento de onda utilizado em testes de citotoxicidade.	
	Teste de Ames. Característica do modelo celular do teste escolhido impede que o teste seja realizado adequadamente.	Células bacterianas, em geral, não fazem endocitose e, por isso, impedem a captação do nanomaterial pela célula.	WATSON <i>et al.</i> , 2014; SINGH <i>et al.</i> , 2009
	Teste do Micronúcleo. Interação de reagentes como a Citocalasina B (CtB).	A CtB pode inibir a endocitose celular interferindo na captação das NPs pela célula.	LANDSIEDEL <i>et al.</i> , 2009; WATSON <i>et al.</i> , 2014; MAGDOLENOVA <i>et al.</i> , 2013; DOAK <i>et al.</i> , 2009;
	Teste do Cometa. Interação com o ADN desprotegido.	Quebra do ADN desprotegido levando a resultado falso-positivo.	WATSON <i>et al.</i> , 2014
Negro de Carbono	Corantes/marcadores utilizados nos testes de citotoxicidade como: MTT, WST-1, CBB (<i>Coomassie Brilliant Blue</i>), Alamar Blue e Vermelho neutro.	O Negro de Carbono quebra o anel tetrazólio do corante, levando a resultado falso-positivo.	MONTEIRO-RIVIERE, INMAN, 2006; CASEY <i>et al.</i> , 2008; MONTEIRO-RIVIERE <i>et al.</i> , 2009; WORLE-KNIRSCH <i>et al.</i> , 2006;
	Fatores pró-inflamatórios.	Adsorção dos fatores pró-inflamatórios.	BROWN <i>et al.</i> , 2010, KOCBACH <i>et al.</i> , 2008
Nanopartículas metálicas	Interfere com a detecção de fluorescência nos testes de toxicidade como DCF, por exemplo.	Adsorção dos corantes utilizados na detecção dos resultados.	PFALLER <i>et al.</i> , 2010 KROLL <i>et al.</i> , 2012
	Interfere com a detecção de absorbância.	Propriedades óticas da nanopartícula.	WATSON <i>et al.</i> , 2014; SINGH <i>et al.</i> , 2009
	Teste de Ames. Característica do modelo celular do teste escolhido impede que o teste seja realizado adequadamente.	Células bacterianas, em geral, não fazem endocitose e, por isso, impedem a captação do nanomaterial pela célula.	LANDSIEDEL <i>et al.</i> , 2009; WATSON <i>et al.</i> , 2014; MAGDOLENOVA <i>et al.</i> , 2013; DOAK <i>et al.</i> , 2009;

Nanomaterial	Interação	Mecanismo (Propostas)	Referências
	Teste do Micronúcleo. Interação de reagentes como a Citocalasina B (CtB).	A CtB pode inibir a endocitose celular interferindo na captação das NPs pela célula.	WATSON <i>et al.</i> , 2014
	Teste do Cometa. Interação com o ADN desprotegido.	Quebra do ADN desprotegido levando a resultado falso-positivo.	WATSON <i>et al.</i> , 2014

Uma análise de literatura feita por Ong e colaboradores (2014) demonstra que, em 2010, aproximadamente 84% das publicações sobre nanotoxicologia utilizaram pelo menos um tipo de teste colorimétrico ou de fluorescência. Desses testes analisados, 95% foram publicados sem a divulgação da utilização de controles apropriados para identificar essa interferência. Esse mesmo grupo fez análise idêntica com as publicações de 2012, para entender se o maior acesso a informação sobre esse tipo de interferência poderia melhorar o planejamento desses testes. Entretanto, os resultados demonstraram que, das publicações de 2012, 90% não reportaram a utilização de controle para essa finalidade. Ainda nesse trabalho, foi relatado que o controle mais comumente utilizado foi a adição das nanopartículas sozinhas com os componentes do teste (2010: 5%, 2012: 8%), seguido da análise da fluorescência/absorvância intrínseca das nanopartículas (2010: 2%, 2012: 5%) e posteriormente o uso concomitante da nanopartícula com um analito (2010: 1%, 2012: 4%). Com relação aos procedimentos adotados como controle, foi ressaltado que apesar do mais utilizado ter sido a adição das nanopartículas aos componentes do ensaio, este método também não é totalmente confiável para o controle da interferência das NP. Pois, quando em condições reais, haverá a interferência de outros fatores, como as proteínas, alterando os resultados, eliminando ou potencializando a interferência. Portanto, fica clara a necessidade da caracterização da ação de cada componente no teste escolhido.

Os testes que utilizam detecção colorimétrica ou de fluorescência, em geral, dependem de reações de oxirredução. Essas reações ocorrem na presença de atividade celular, porém,

notou-se que algumas NPs metálicas também podem interagir com o corante/marcador (e.g., alamar blue, DCF) causando sua redução (ONG *et al.*, 2014).

As propriedades óticas variam tanto com a composição química do material como com suas propriedades físicas (tamanho da partícula, formato, cristalinidade, dentre outras). De forma geral, tanto o teste Alamar Blue como o MTT são afetados por essa interferência, pois nesses testes a fluorescência indica viabilidade celular e como algumas nanopartículas também são capazes de gerar fluorescência acaba-se gerando resultado falso positivo, levando à subestimação do impacto toxicológico dessas nanopartículas. Por outro lado, a interferência de nanopartículas nos testes que medem o estresse oxidativo celular pode superestimar seu impacto toxicológico (MONTEIRO-RIVIERE; INMAN, 2006; CASEY *et al.*, 2007; DOAK *et al.*, 2009; MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2009; WORLE-KNIRSCH *et al.*, 2006; KROLL *et al.*, 2009; ONG *et al.*, 2014).

As nanopartículas também demonstraram interferir na conformação de algumas proteínas e, dessa forma, diminuir sua atividade enzimática. Como exemplo pode-se citar a interferência de NPs com atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH), enzima utilizada no teste para a avaliação da viabilidade celular. Assim como também existe informação sobre atividade catalítica de NPs na redução do INT (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolium cloro), semelhante à ação catalítica da LDH (KROLL *et al.*, 2012). Além disso, também cabe ressaltar os efeitos da adição de proteínas ao teste e sua influência na estabilidade das nanopartículas e, por consequência, na sua atividade no ensaio (ONG *et al.*, 2014).

No estudo de Magdolenova e colaboradores (2012b) foi observada a interação da citocalasina B (CtB), um inibidor de polimerização da actina, com os processos de citocinese e endocitose celular. Foi observado que esse bloqueio da endocitose poderia impedir a captação das NPs pela célula. Uma solução para esse efeito seria a incubação das células primeiramente com as NPs e posteriormente com a CtB, permitindo assim a adequada captação das NPs. Ainda nesse estudo, analisou-se a interferência das NPs com o teste do Cometa. Dentre as possíveis interações, resalta-se a indução de quebras no ADN desprotegido, o que poderia levar a resultados falso-positivos, porém essa interação ainda é controversa.

Conforme analisado no estudo de Hayashi e colaboradores (2013) e Magdolenova e colaboradores (2012a) o reconhecimento biológico da corona proteica pela célula é importante para a captação das NPs. No estudo de Hayashi e colaboradores (2013) as NPs que possuíam em sua corona proteínas consideradas “nativas” para a célula eram mais

rapidamente acumuladas dentro das células. Isso seria importante para a escolha do modelo celular que pudesse realmente prever o comportamento das NPs nas células humanas. No estudo de Magdolenova e colaboradores (2012a) foi discutida como a adição de proteínas à solução de estoque pode alterar o potencial de aglomeração do nanomaterial por induzir a formação da corona proteica que ajudaria no processo de dispersão do nanomaterial, mas, por outro lado, também poderia alterar o efeito tóxico do nanomaterial. Seria uma discussão importante avaliar como a composição da corona proteica influencia na avaliação toxicológica do nanomaterial.

Outro mecanismo de interferência importante é a adsorção de fatores pró-inflamatórios às nanopartículas. Isso ocorre, por exemplo, na interação entre GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos), TGF- β (fator de transformação do crescimento beta), TNFa (fator de necrose tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8) e nanopartículas de óxido de metal e negro de carbono (também tradicionalmente conhecido como negro de fumo). Esse efeito deve ser analisado levando-se em consideração a elevada área e energia de superfície das nanopartículas que propiciam a maior adsorção desses fatores. Além dos fatores pró-inflamatórios, pode-se citar também a adsorção de nutrientes e reagentes do meio. Esse caso é observado, por exemplo, com os nanotubos de carbono. O conhecimento dessa interação é muito importante para a interpretação de resultados falso-negativos e falso-positivos (MONTEIRO-RIVIERE; INMAN, 2006; KOCBACH *et al.*, 2008; BROWN *et al.*, 2010; KROLL *et al.*, 2012).

Outras interações podem surgir pela existência de interações eletrostáticas entre as NPs e os materiais do teste. Deve-se entender o quanto a carga da NP (positiva ou negativa) leva à interferência observada. Além disso, deve-se entender se a interação observada advém somente desse critério ou se poderia ter outras características da NP potencializando a interação. Nem sempre o comportamento das NPs segue um padrão de interação definido. Existe dado que mostra que tanto NPs positiva quanto negativamente carregadas podem interferir com o marcador tetrazólio. Além disso, a mesma NP pode interferir e não interferir com o mesmo marcador em testes diferentes. Por isso, é importante utilizar a maior quantidade de informação sobre as características das NPs para se entender os resultados obtidos (ONG *et al.*, 2014).

É importante determinar os desfechos que se quer analisar para que se possa comparar os resultados de diferentes testes. Isso ajudará a interpretar os resultados obtidos. Um exemplo disso pode ser visto na tabela 5, na qual é feita a comparação dos resultados dos

testes de genotoxicidade de diferentes nanomateriais. Como pode-se ver existem contradições nos resultados obtidos com os diferentes testes disponíveis atualmente.

Tabela 5: Resultado da avaliação de diferentes tipos de nanoestruturas nos ensaios de genotoxicidade.

Nanomaterial	Teste de Ames	Teste de Aberração Cromossômica	Teste do Micronúcleo	Teste do Cometa	Teste de Genotoxicidade <i>in vivo</i>
Nanotubo de carbono (parede simples)	-	+	+	+	+
Nanotubo de carbono (paredes múltiplas)	-	-	+	+	+
TiO ₂	-	-	+	+	-
ZnO	-	+	-	+	-
NPAg	-	+	+	+	+
Sílica	-	+	+	+	+
Óxido de alumínio	-	+	+	+	+
Óxido de ferro	-	+	+	+	+

TiO₂ – Dióxido de titânio; ZnO – Óxido de zinco; NPAg – Nanopartículas de prata; (-) negativo; (+) positivo.
Fonte: DOAK et al., 2012.

Essas aparentes contradições de resultados, nos testes mencionados na tabela 5, podem estar relacionadas a diferenças nos materiais utilizados em cada teste realizado ou, até mesmo, às mencionadas interferências entre os nanomateriais e os componentes do teste toxicológico. Como exemplo mais detalhado pode-se citar o teste de Ames e o teste do Micronúcleo. O teste de Ames, conforme pode-se analisar na tabela 5, em geral, leva a resultados negativos para a avaliação de nanomateriais. Esses mesmos nanomateriais geram resultados positivos para genotoxicidade em outros testes. As diferenças encontradas entre os resultados de distintos estudos podem estar relacionadas com alterações na dose utilizada do nanomaterial, à escolha dos insumos utilizados nos testes (dispersantes, por exemplo) e a alterações nas características físico-químicas do nanomaterial em análise. Entretanto, diferenças são observadas em testes realizados no mesmo estudo. Nestes casos, acredita-se que os resultados divergentes sejam oriundos das diferenças entre os modelos utilizados em cada teste. No caso do teste de Ames são utilizadas células bacterianas que podem diminuir a

captação do nanomaterial por sua inabilidade em realizar endocitose e pela presença da parede celular. Nesse mesmo sentido, deve-se considerar que se a toxicidade genotóxica é originada por mecanismos secundários, deve-se assegurar que os mediadores dessa atividade também sejam captados pela célula bacteriana. Além disso é muito importante recordar que alguns nanomateriais possuem atividade antimicrobiana (DOAK et al., 2012).

Com relação ao teste do Micronúcleo, deve-se considerar a grande variabilidade de protocolos utilizados. As variações adotadas nos diferentes estudos dificultam muito a análise dos resultados obtidos. Dentre as variações pode-se citar a falta de alinhamento entre o período de exposição escolhido, conteúdo do meio utilizado, protocolo de exposição dos nanomateriais aos componentes do teste (co-exposição ou exposição sequencial), como a Citocalasina B e a utilização de diversas linhagens celulares (DOAK et al., 2012).

Após a revisão das possíveis limitações dos testes toxicológicos utilizados atualmente para a avaliação de nanomateriais, sejam elas advindas dos componentes e procedimentos do teste ou pelas características dos nanomateriais, nota-se que o reconhecimento dessas limitações é um fator importante para a escolha do teste mais adequado, assim como das adaptações necessárias para uma análise consistente. Soma-se a isso a falta de conhecimento sobre como e quais propriedades específicas dos nanomateriais são críticas para seus efeitos diferenciados. Sendo assim, ainda não é possível identificar um processo sistemático de revisão das características toxicológicas que seja aplicável para todos os nanomateriais (SCENIHR, 2006; 2007). Porém, enquanto não se tem informação suficiente para definir o melhor sistema de avaliação, sabe-se que é possível aproximar os testes existentes das necessidades dos nanomateriais. Dentre esses pontos, pode-se citar:

- a) seleção da dose adequada para os testes toxicológicos;
- b) estudos sobre dose-resposta dos nanomateriais em modelos *in vitro* e *in vivo*, levando-se em consideração o auxílio de modelos computacionais, quando possível;
- c) seleção da linhagem celular para os estudos *in vitro*, levando-se em consideração a estabilidade do cariótipo celular;
- d) seleção do tipo de cultura (3D ou 2D);
- e) caracterizar adequadamente o tempo de exposição dos nanomateriais nos testes de avaliação de toxicidade, considerando-se, quando aplicável, períodos de exposição prolongados (exposição crônica);
- f) com relação ao teste de genotoxicidade, utilizar testes que avaliem diferentes tipos de danos genéticos, incluindo danos secundários por inflamação crônica;

g) testes de estabilidade do nanomedicamento em diferentes cenários, incluindo teste de degradação do nanomedicamento para se obter dados sobre os possíveis intermediários e suas toxicidades;

h) adequada caracterização físico-química dos nanomateriais, sendo esse um dos critérios mais importantes para a análise e discussão de todos os resultados dos testes toxicológicos.

Portanto, todas as possíveis interações entre os nanomateriais e os vários componentes dos ensaios toxicológicos devem ser cuidadosamente analisadas antes de se determinar o plano de avaliação toxicológica do nanomedicamento. Além disso, a utilização de múltiplos testes para a avaliação de cada parâmetro é importante, justamente para tentar identificar as possíveis falhas de determinados testes de acordo com os nanomateriais testados. A utilização de mais de um ensaio na bateria de testes não garante ou assegura um resultado correto, apenas minimiza as possíveis deficiências de alguns testes, levando a um resultado mais robusto.

Conforme mencionado acima, cabe ressaltar a importância da avaliação de todos os possíveis contaminantes de um nanomedicamento, sendo necessário, para isso, conhecer bem o seu processo de fabricação, para a identificação das possíveis etapas e materiais utilizados que possam levar à contaminação do produto finalizado. Essa avaliação é importante mesmo quando os fabricantes informam que o produto não está contaminado.

5.4 Padronização da terminologia utilizada para nanotecnologia

Após essa revisão bibliográfica foi possível vivenciar a dificuldade para compilar as informações publicadas sobre os nanomateriais. Essa dificuldade é, dentre outras causas, fruto da falta de padronização da terminologia e metodologia analítica utilizada por diversos países, pesquisadores e indústrias para a caracterização e avaliação de seus produtos ao longo dos anos. Atualmente, já existem publicados alguns documentos que têm por objetivo a padronização dessas definições, principalmente, para finalidade regulatória. Dentre essas publicações estão:

- *Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes.*
- *ISO standards/TC 229 Nanotechnologies.*

Não é necessário esperar que se tenha um nível de evidência elevado para que se possa definir a terminologia adequada para o que se pretende estudar. A definição de terminologia deve ser uma atividade dinâmica, que permita seu aperfeiçoamento à medida que a ciência se desenvolva. Essa definição é de extrema importância para a evolução da ciência, pois somente dessa forma um pesquisador poderá saber que está estudando o mesmo tema ou material que um outro. Portanto, deve-se entender os projetos que visam estabelecer definições como projetos que vão evoluir e, portanto, entender que mesmo eles não sendo tão perfeitos como seria desejável, vale a pena aceitá-los e contribuir para o seu desenvolvimento. À medida que os conhecimentos sobre os materiais nanotecnológicos evoluírem, as terminologias vão ficando mais claras e específicas. Seguramente será necessário entender mais sobre as características físicas, químicas e biológicas desses materiais para assegurar que estão sendo utilizados os parâmetros adequados para as classificações.

É provável que as definições existentes atualmente abram margem a críticas entre os especialistas. Mas deve-se manter em mente a imprescindibilidade do estabelecimento de parâmetros para a padronização dos nanomateriais tanto para critérios regulatórios como para o avanço da ciência. Aceitar uma versão mais restritiva das definições pode deixar escapar a análise de uma parte dos nanomateriais, que no futuro pode ser designada como nanomaterial. Entretanto, a aceitação de uma versão mais ampla das definições pode demandar um tempo precioso para a classificação e análise de dados que não necessariamente são diferentes dos observados com os materiais em macroescala. A priorização da qualidade da informação obtida é essencial frente à quantidade, pelo menos nesse primeiro momento.

A definição de nanomaterial baseada nas características diferenciadas advindas da nanoescala pode ser a melhor forma de categorizar-se esses materiais; entretanto, ainda não é possível, dadas as limitações de conhecimento que se tem atualmente. Dessa forma, busca-se um consenso para um processo heurístico frente ao algorítmico nesse momento de desenvolvimento da nanotecnologia. Sendo assim, possibilitaria maior flexibilidade para se adaptar os procedimentos ou características que levariam à categorização dos nanomateriais e não à aceitação de regras rígidas somente para seguir um padrão.

Foge ao escopo do presente trabalho exaurir a discussão referente à classificação de cada tipo de nanoestrutura, mantendo-se apenas a indicação de se tratar de uma área importante, inclusive porque delimita a abordagem regulatória. Aguarda-se uma maior harmonização entre os diferentes países quanto ao assunto.

5.5 Base de dados disponíveis sobre produtos nanotecnológicos

Outro item importante que já está sendo implementado nos EUA e na Europa é o melhoramento das bases de dados sobre produtos nanotecnológicos. Essas bases de dados vão permitir uma melhor avaliação das informações de segurança disponíveis até o momento para os nanomedicamentos. Espera-se que, dessa forma, seja possível identificar e quantificar os riscos e perigos advindos dessa tecnologia. Dentre as bases de dados disponíveis, pode-se citar:

- *OECD Database on Research into the Safety of Manufactured Nanomaterials*: base de dados disponível publicamente a partir de abril de 2009. Essa base de dados coleta informação sobre projetos de pesquisa e identifica áreas que necessitam desenvolvimento. Dessa forma, esses dados podem auxiliar e direcionar futuras pesquisas nessa área. Até o momento constam aproximadamente 800 projetos descritos nessa base de dados, a qual está disponível no seguinte endereço eletrônico:

<http://webnet.oecd.org/NANOMATERIALS/Pagelet/Front/Default.aspx>.

- *Nanomaterial Registry* – Essa é uma base de dados pública, patrocinada pelo NIH (*National Institutes of Health*) após o reconhecimento da sua necessidade pela Iniciativa Nacional em Nanotecnologia (NNI), em seu programa chamado *Nanotechnology Signature Initiative* (NSI) para o desenvolvimento da Infraestrutura do Conhecimento em Nanotecnologia (*Nanotechnology Knowledge Infrastructure* - NKI). Através de uma infraestrutura digital robusta, essa base de dados apoia o compartilhamento de informação, estimula a colaboração e a inovação para o desenvolvimento de conhecimento em nanotecnologia. Está disponível no endereço eletrônico:

<https://www.nanomaterialregistry.org/Default.aspx>.

No Brasil, provavelmente por estar no início de sua prospecção sobre as necessidades regulatórias, não foi encontrada divulgação sobre projeto para a implementação de bases de dados para as informações advindas dos produtos nanotecnológicos.

Apesar de existirem bases de dados disponíveis para a análise dos projetos que estão em andamento, o acesso ao conteúdo da pesquisa para que se possa fazer análise dos dados

ainda não é feito de forma flexível o suficiente para que a busca seja completa e útil para múltiplos propósitos. Com as bases que existem até o momento pode-se ter bom entendimento do tipo de projeto que está em andamento e quem seria o pesquisador principal. Esses dados ajudam a direcionar futuras pesquisas, mas ainda não são suficientes para que outro pesquisador possa compilar as informações de segurança de um determinado produto, por exemplo.

Por fim, independente do formato, estrutura e exclusividade da base de dados, é importante que o consumidor, direto ou indireto (paciente ou profissional de saúde), tenha acesso a um portal seguro para a busca de informação segura sobre o tema, mesmo que seja para esclarecimento sobre a falta de informação, facultando a avaliação da relação de risco/benefício ao profissional de saúde e não ao “acaso”.

5.6 Revisão da aprovação de um produto nanotecnológico: DOXIL[®]

O DOXIL[®], doxorubicina lipossomal peguilada, foi escolhido para ser analisado nesse trabalho por ser o primeiro lipossoma aprovado pelo FDA, em 1995, inicialmente indicado para o tratamento do Sarcoma de Kaposi relacionado à infecção por HIV em pacientes refratários à quimioterapia e, posteriormente, desenvolvido para outros tipos de tumores. Além disso, pela importância da doxorubicina no tratamento do câncer, esse fármaco é considerado um dos tratamentos quimioterápicos mais efetivos já desenvolvido, sendo considerado para as primeiras linhas de tratamento de várias neoplasias (leucemias, linfomas, câncer de mama, útero, ovário e pulmão) desde seu desenvolvimento até os dias atuais, porém seu perfil toxicológico restringe seu uso. Dessa forma, faz-se muito importante o estudo de novas formulações que possam reduzir seus efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida do paciente e ampliando a utilização do tratamento (BARENHOLZ, 2012; WEISS, 1992; MINOTTI, 2004).

5.6.1 Propriedades antineoplásicas e mecanismo de ação da doxorubicina

O cloridrato de doxorubicina (figura 7), também chamado de adriamicina, é um antibiótico antitumoral, citotóxico, da classe das antraciclina, isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*. Os antibióticos antracíclicos possuem uma estrutura de anel tetraciclina com um açúcar incomum, a daunosamina, fixado por ligação glicosídica. Possuem componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, que lhes permitem atuar como aceptores e doadores de elétrons.

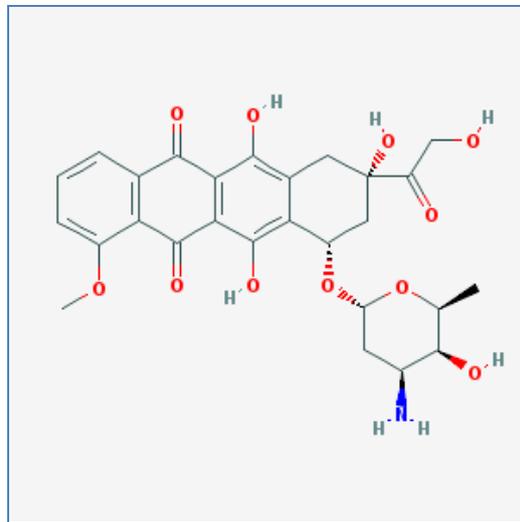


Figura 7: Fórmula Estrutural da Doxorubicina ($C_{27}H_{29}NO_{11}$). Fonte: PubChem Compound.

As propriedades citotóxicas da doxorubicina sobre as células cancerígenas e os efeitos tóxicos em vários órgãos ainda não estão completamente elucidados. Evidências sugerem que as antraciclina apresentam, pelo menos, três mecanismos de ação: (1) formação de ligações com os grupos fosfolipídicos da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de íons, promovendo a superprodução de radicais livres do oxigênio e ceramidas; (2) formação de ligações interfilamentares com o ADN, o que leva ao bloqueio da síntese do ARN e diminuição da atividade da topoisomerase II (TopII), promovendo a ruptura dos filamentos de ADN e (3) formação de adutos de estrutura complexa por ligações covalentes com o ADN (GEWIRTZ, 1999; MINOTTI *et al.*, 2004; SENCHENKOV *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2014).

A interação da doxorubicina com a topoisomerase-II, para formar complexos de ADN passíveis de clivagem, parece ser um importante mecanismo da atividade citocida do

fármaco. A reação de redução enzimática da doxorubicina por uma série de oxidases, redutases e desidrogenases dá origem a espécies altamente reativas do radical livre hidroxila. A formação de radicais livres implica na cardiotoxicidade da doxorubicina, devido à redução do Cu(II) e do Fe(III) em nível celular. As células tratadas com doxorubicina manifestaram alterações nas características morfológicas associadas à apoptose ou morte celular programada. A apoptose induzida por doxorubicina pode ser um componente integral do mecanismo de ação celular relacionado ao efeito terapêutico, à toxicidade ou a ambos (MINOTTI *et al.*, 2004).

A doxorubicina demonstrou significativo benefício clínico para o tratamento de pacientes com tumores sólidos e hematológicos. Mas, infelizmente, além do surgimento de resistência a esse tratamento, seu perfil de eficácia está intimamente relacionado com um alto potencial toxicológico. Dentre os eventos adversos pode-se citar a cardiotoxicidade como fator de maior relevância para a limitação do uso desse medicamento na terapêutica oncológica. (MINOTTI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2014).

5.6.2 Dados pré-clínicos e clínicos sobre a segurança da doxorubicina

Os testes de curto prazo para a avaliação da genotoxicidade em células de mamíferos sugerem que essa toxicidade seja iniciada pela estabilização de complexos ternários entre ADN-Fármaco-TopII, assim como pela intercalação ao ADN e geração de espécies reativas de oxigênio. A estabilização do complexo ADN-Fármaco-TopII impede o reparo das rupturas do ADN criadas pela enzima (TopII) e pode propiciar a deleção ou rearranjo de fragmentos do ADN. A doxorubicina pode induzir a formação de radicais livres em virtude do seu grupo quinona. Esses radicais livres (e.g., peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) interagem com o ADN e oxidam as suas bases. Além disso, a doxorubicina também interage com as membranas celulares, produzindo peróxidos lipídicos e alterando as funções da membrana. A genotoxicidade induzida pela indução da formação de radicais livres e a interação com a membrana é dependente da interação da doxorubicina com a topoisomerase. Essas lesões são manifestadas por troca entre cromátides-irmãs, aberração cromossômica e mutação genética. A deleção ou recombinação de genes são importantes tanto para o processo de genotoxicidade como para a citotoxicidade induzida pelo tratamento com agentes inibidores da topoisomerase (ANDERSON, 1994).

A carcinogenicidade relacionada à doxorubicina pode ser demonstrada pelo aumento da incidência de leucemia mieloide aguda (LMA) após a terapia com agentes inibidores de topoisomerase. A incidência de neoplasias secundárias ao tratamento com agentes inibidores de topoisomerase II tem sido descrita há um longo tempo e é considerada como um fator de mau prognóstico para o paciente. Os dados sugerem que a exposição à doxorubicina pode resultar na translocação t(15;17)(q22;q21), que resulta na fusão dos genes PML (gene da leucemia promielocítica) e RAR α (receptor do ácido retinóico alfa), gerando mRNA para a expressão da proteína quimérica PML-RAR α . Essa translocação é característica da LMA (NEGRINI; FELIX; MARTIN, 1993; ANDERSON; NATHAN, 1994; FORTUNE; OSHEROFF, 2000; MISTRY *et al.*, 2005; KOONTZ *et al.*, 2013)

Os agentes inibidores de TopII também demonstram toxicidade reprodutiva. Essa toxicidade é apresentada tanto em homens como em mulheres, diminuindo a sobrevivência do embrião, feto e neonato. Além disso, foram demonstradas também alterações no desenvolvimento do feto. A doxorubicina atravessa a placenta, podendo gerar abortos espontâneos. Anormalidades congênitas foram demonstradas em filhos de homens que foram tratados com doxorubicina. Demonstrou-se a alteração de ciclos menstruais (ciclos irregulares e amenorreia) com a terapia combinada de doxorubicina, ciclofosfamida e metotrexato para o tratamento de sarcomas, assim como a inibição da produção de espermatozóide ou sua diminuição pelo tratamento com a combinação de doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina (GREEN *et al.*, 1991; GREEN, 1997).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram a incidência aumentada de formação de micronúcleos em diferentes linhagens celulares e em camundongos tratados com doxorubicina (BOUCHER *et al.*, 1993; AMARA-MOKRANE *et al.*, 1996; JAGETIA; VIJAYASHREE, 1996).

Portanto, a doxorubicina demonstrou ser mutagênica e induzir aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides-irmãs e formação de micronúcleos em diferentes tipos de células de mamíferos, incluindo células humanas (IARC, 1987; DHAWAN *et al.*, 2003; AMARA-MOKRANE *et al.*, 1996). No estudo de Dhawan e colaboradores (2003) foram utilizados linfócitos de sangue periférico de homens saudáveis para a demonstração do efeito clastogênico (indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular) e aneugênico (aneuploidia ou poliploidia) da doxorubicina.

Isso posto, deve-se considerar também o perfil clínico de toxicidade desse medicamento. E para isso cabe ressaltar as toxicidades agudas mais importantes da doxorubicina observadas nos testes clínicos: mielossupressão, mucosite, alopecia, náuseas,

diarréia, vômito, dentre outras. Além disso, como a doxorubicina é um agente vesicante potente, deve-se ter cuidado para não o deixá-lo extravasar, pois pode levar a necrose grave do tecido adjacente à aplicação. A mielossupressão é uma das toxicidades que limitam o tratamento do paciente. A leucopenia, de forma geral, atinge seu valor mínimo durante a segunda semana de tratamento, com recuperação na quarta semana. A doxorubicina pode produzir toxicidade local grave em tecidos irradiados (e.g., pele, coração, esôfago e mucosa gastrintestinal) (RASHEED, 2011).

A cardiotoxicidade é uma característica das antraciclina e pode ser dividida em 2 tipos. O primeiro tipo seria a forma aguda da doença, caracterizada por alterações temporárias e reversíveis. A cardiotoxicidade aguda é reversível e seus sintomas clínicos são: taquicardia, hipotensão, alterações no eletrocardiograma e arritmias. Essa toxicidade desenvolve-se durante a infusão do tratamento ou dentro de poucos dias do seu início. É possível diminuir a incidência de cardiotoxicidade pela diminuição da velocidade de infusão da doxorubicina. O segundo tipo, seria a toxicidade cumulativa crônica relacionada com a dose (em geral, com doses totais ≥ 550 mg/m²). A cardiotoxicidade crônica não é reversível. A incidência da cardiotoxicidade crônica dá-se principalmente nos primeiros 3 meses do tratamento, mas pode ocorrer também muitos anos depois do tratamento, manifestando-se por insuficiência cardíaca congestiva que não responde aos digitálicos. A incidência de cardiomiopatia depende da dose cumulativa, do esquema posológico, da existência de história prévia de doença cardíaca, hipertensão, uso prévio de antraciclina, coadministração com outros agentes quimioterápicos (e.g., paclitaxel, ciclofosfamida, trastuzumabe), dentre outros fatores. A frequência de miocardiopatia grave é de 1 – 10% dos pacientes, com doses totais abaixo de 450 mg/m². O risco aumenta acentuadamente (para mais de 20% dos pacientes) com doses totais > 550 mg/m² (RASHEED, 2011).

5.6.3 Racional para a escolha da doxorubicina, do lipossoma e da pegulação para o desenvolvimento da nova formulação.

Como exposto anteriormente, a doxorubicina é um agente antineoplásico amplamente utilizado e com reconhecida eficácia para o tratamento de diversas neoplasias (por exemplo, leucemias, câncer de mama e sarcomas). Conforme descrito no item anterior, seu perfil toxicológico inclui efeitos adversos que podem limitar a sua utilização, como:

cardiomiopatia, mielossupressão, alopecia, mucosite, náuseas, vômito, anorexia, dentre outros. Portanto, mesmo com seu excelente perfil de eficácia, esse medicamento acaba sendo posicionado de forma restrita na terapêutica do câncer (WINER, 2001). Com o intuito de melhorar esse perfil de tolerabilidade, foi desenvolvida uma nova formulação para carrear a doxorubicina, diminuindo sua interação com as células saudáveis do organismo. Essa formulação é baseada na inclusão da doxorubicina em lipossomas (DOX lipossomal).

Os lipossomas são formados através de processos de autoassociação de bicamadas fosfolipídicas num sistema aquoso, sendo as estruturas resultantes termodinamicamente mais favorecidas. Dessa interação ocorre a agregação dos fosfolipídios formando uma bicamada esférica, englobando parte do solvente no seu interior. Essas estruturas podem ser formadas por uma ou várias bicamadas fosfolipídicas concêntricas, chamados, respectivamente, de lipossoma monolamelar e multilamelar. As principais matérias-primas utilizadas no preparo dos lipossomas são o colesterol e a fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina (lecitina) e o colesterol são constituintes estruturais da maioria das membranas biológicas e, por isso, sua utilização na membrana lipossomal possibilita aumentar a estabilidade da formulação. Outro benefício da adição do colesterol ao lipossoma é a exploração do seu efeito modulador da fluidez da bicamada fosfolipídica. Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras localizam-se no compartimento aquoso e as últimas inseridas ou adsorvidas na membrana lipossomal (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; NEW, 1990; PUISIEUX *et al.*, 1995).

A revisão feita por Tardi, Boman e Cullis (1996) sobre a DOX lipossomal mostra a importância das propriedades físicas da DOX lipossomal em relação à biodisponibilidade, à biodistribuição e ao perfil de toxicidade quando comparada à formulação convencional da doxorubicina. Além disso, mostra que a toxicidade da formulação está relacionada com a capacidade de armazenamento do fármaco no lipossoma *in vivo*. Essa revisão mostra também o benefício de técnicas de estabilização do lipossoma para aumentar o tempo de circulação e a atividade antitumoral. Dentre as técnicas de estabilização pode-se citar a peguilação, processo através do qual as moléculas de polietilenoglicol (PEG) são ligadas ao lipossoma.

A peguilação gera um impedimento estérico entre o lipossoma e as opsoninas plasmáticas, o que favorece o perfil farmacocinético do lipossoma peguilado. Comparando a captação do lipossoma convencional e do peguilado pelo sistema fagocítico mononuclear, demonstrou-se que até 70% da dose administrada dos lipossomas convencionais foram encontradas nos tecidos como fígado, baço e medula óssea. Com relação ao lipossoma

peguilado, esse percentual diminui para 10 a 15% quando se considera a captura pelo fígado e pequenas proporções em outros órgãos.

De acordo com Gabizon e Martin (1997), durante o desenvolvimento dos lipossomas convencionais (não peguilados) pode-se notar a dificuldade de manter a estrutura lipossomal íntegra quando presente na circulação sanguínea, o que tem por consequência a liberação do ativo, que está sendo carregado, na circulação – efeito indesejado. Além disso, esses lipossomas são reconhecidos mais facilmente pelo sistema fagocítico mononuclear (e.g., macrófagos, células micróglia, células de Kupffer) e possuem menor extravasamento no tecido tumoral do que os lipossomas peguilados. Esses problemas foram amenizados pelo desenvolvimento dos lipossomas peguilados (por exemplo, STEALTH[®]).

A “peguilação” altera tanto as características físico-químicas do lipossoma como a sua farmacocinética e, mais especificamente, sua biodistribuição (HARRIS; CHESS, 2003). Dessa forma, o tempo de circulação sanguínea do sistema lipossomal peguilado é aumentado e possibilita o direcionamento passivo do fármaco para o tecido tumoral através do seu extravasamento pelo endotélio do tecido tumoral, que tem por característica ser mais fenestrado que o tecido saudável. Além disso, como o tecido tumoral carece de sistema linfático eficiente, o sistema lipossomal demonstra maior acúmulo neste local (MAEDA et al., 2000).

O DOXIL[®] é a formulação do cloridrato de doxorubicina encapsulado em lipossomas STEALTH[®] (figura 7), composto de metoxipolietilenoglicol (MPEG-DSPE), fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada (HSPC) e colesterol (figura 8). Esse processo é chamado de peguilação e visa proteger o lipossoma da sua detecção pelo sistema fagocítico mononuclear, aumentando o tempo de circulação no organismo.

O MPEG-DSPE, um composto anfifílico, é responsável pelo prolongamento da circulação do lipossoma. O balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) é essencial para sua disposição apropriada entre as regiões lipofílicas da superfície do lipossoma e o meio aquoso. O tempo de circulação plasmática dos lipossomas é sensível a alterações no tamanho da cadeia de MPEG-DSPE.

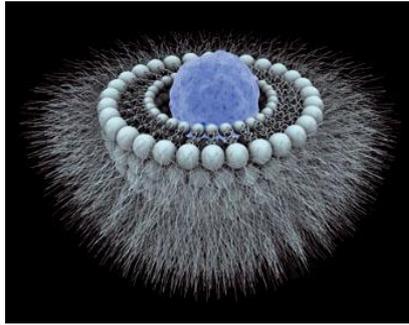


Figura 8: Esquema da estrutura do Doxil®. Fonte: CNRS.

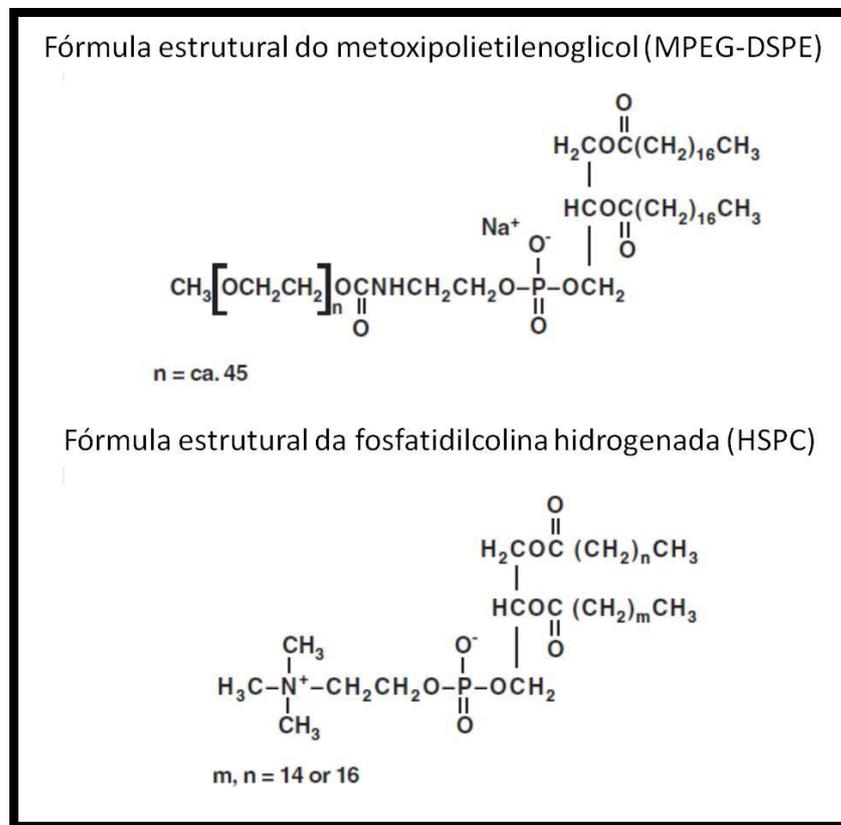


Figura 9: Fórmulas estruturais do MPEG-DSPE e HSPC. Fonte: Monografia do produto Doxil®.

Dessa forma, expõe-se o racional para a escolha da doxorubicina, do lipossoma e da peguilação para o desenvolvimento de um novo produto que pudesse trazer benefícios para o paciente oncológico. Entretanto, após a fase da escolha do fármaco e seu sistema carreador, é necessário testá-los em ensaios pré-clínicos e clínicos para que seja avaliado o perfil de eficácia e tolerabilidade do novo medicamento nos pacientes, o que será discutido a seguir.

5.6.5 Dados pré-clínicos que embasam o desenvolvimento do DOXIL[®]

Levando em consideração o DOXIL[®], pode-se ver na tabela 6 o impacto da sua formulação na farmacocinética da doxorubicina convencional.

Conforme estudo de Vail e colaboradores (2004), o encapsulamento da doxorubicina em lipossomas peguados influencia significativamente a sua farmacocinética, como demonstrado por estudos em animais (tabela 6). Essas alterações são importantes para aumentar a biodistribuição da doxorubicina e, principalmente, seu acúmulo no local de ação, pois o desenvolvimento dessa formulação tem por objetivo aumentar a eficácia da doxorubicina e diminuir seu impacto toxicológico em comparação com sua formulação convencional.

De acordo com os resultados mostrados nas tabelas 6 de estudos farmacocinéticos comparativos entre o Doxil[®] e a doxorubicina convencional em ratos, coelhos e cães, pode-se notar a redução no volume de distribuição e no *clearance* plasmático, aumento no tempo de meia-vida, no tempo de residência na circulação sanguínea e na área sob a curva concentração vs tempo (ASC). Os níveis plasmáticos de doxorubicina após administração de DOXIL[®] mantêm-se muito baixos, o que indica que a doxorubicina dessa formulação permanece encapsulada no lipossoma enquanto está na circulação sanguínea. O volume de distribuição (V_d) reduzido também evidencia a influência do lipossoma na disposição da doxorubicina. A concentração plasmática de doxorubicina e a ASC após a administração de DOXIL[®] são dose-dependentes, ao contrário do tempo de meia-vida plasmático ($t_{1/2}$), do V_d e do *clearance* (Cl), que variam independentemente da dose.

Tabela 6: Alteração dos parâmetros farmacocinéticos da doxorubicina entre DOXIL[®] e Doxorubicina Livre em modelos animais.

	$t_{1/2}$ (h)	ASC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Cl (mL/h)	V_β (mL)
RATO				
PLD (1mg/Kg)	$\lambda_1: 1,8$ $\lambda_2: 23,6$	683 ($>95\% \lambda_2$)	0,4	13
DOX Livre (0,9 mg/Kg)	$\lambda_1: 0,16$ $\lambda_2: 29,1$	11,1 ($>80\% \lambda_1$)	24,3	1014
COELHO				

	$t_{1/2}$ (h)	ASC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	Cl (mL/h)	V_{β} (mL)
PLD (1mg/Kg)	$\lambda_1: 0,5$ $\lambda_2: 21,3$	368 ($>95\% \lambda_2$)	6,0	176
DOX Livre (1 mg/Kg)	$\lambda_1: 0,03$ $\lambda_2: 4,07$	1 ($>80\% \lambda_1$)	2536	13651
CÃO				
PLD (1,5 mg/Kg)	$\lambda_1: 0,20$ $\lambda_2: 425,9$	656 ($>95\% \lambda_2$)	15,5*	596
DOX Livre	ND	ND	ND	ND

Cl: *clearance*; V_{β} : volume de distribuição; λ_1 : meia-vida inicial; λ_2 : segunda meia-vida; ASC: área sob a curva concentração vs tempo.
 ND: Não determinado.
 * Volume de distribuição no estado de equilíbrio estável.

Fonte: VAIL *et al.*, 2004.

Além da análise dos parâmetros farmacocinéticos, é importante fazer a avaliação do quanto essas alterações influenciam no perfil toxicológico do medicamento. Sendo assim, o estudo de Kanter e colaboradores (1993) avalia o potencial toxicológico da doxorubicina lipossomal comparada à doxorubicina livre e ao lipossoma vazio em camundongos e cães (Beagles). O tratamento dos animais durante o estudo foi feito com diferentes doses de doxorubicina lipossomal (15, 20, 25, 30, 40mg/Kg), doxorubicina livre (10, 15, 20, 22,5, 25mg/Kg) e lipossoma vazio (20, 40, 80mg/Kg). Todos os camundongos que sobreviveram aos 30 dias iniciais do período de observação foram avaliados por mais 11 meses. Nesse período foi avaliada a sobrevivência dos animais, sendo 50% (45/90) no grupo da doxorubicina lipossomal; 28% (26/36) no grupo da doxorubicina livre e 89% (11/95) no grupo do lipossoma vazio. Essa letalidade indica que a formulação lipossomal da doxorubicina é menos tóxica que a formulação livre. A DL_{50} da formulação lipossomal foi de 32mg/Kg (dose única) comparada a 17,5mg/Kg para doxorubicina livre (DOX livre). A toxicidade do lipossoma não demonstrou ser aditiva à da doxorubicina. Esses dados foram semelhantes aos coletados para os Beagles. Nesse último grupo pode-se notar maior capacidade dos Beagles para suportar altas doses de doxorubicina lipossomal em comparação com a formulação livre. Entre as principais diferenças encontradas entre as formulações lipossomal e livre da doxorubicina está uma maior sintomatologia pós-infusional no grupo da DOX livre, que pode estar relacionada à liberação de histamina, e no grupo da DOX lipossomal pode-se citar a pirogenicidade, i.e., elevação da temperatura corpórea. Essa pirogenicidade não foi demonstrada nem no grupo da DOX livre nem no grupo do lipossoma vazio, demonstrando ser uma resposta específica da DOX lipossomal.

Conforme citado por Piver e colaboradores (1985), a dose total recomendada de DOX livre é limitada a 550mg/m^2 , mas existem relatos de que doses mais baixas, como 350mg/m^2 , podem reduzir significativamente a fração de ejeção cardíaca. Com relação à toxicidade cardíaca, podem-se citar os estudos de Forssen e Tokes (1981) e Kanter e colaboradores (1993). No estudo de Forssen e Tokes (1981) foram analisados os tecidos cardíacos dos camundongos tratados com DOX livre e lipossomal. Os tecidos foram analisados por microscopia eletrônica para a confirmação das alterações induzidas, caracteristicamente, pela DOX livre. Dentre essas alterações pode-se citar: vacuolização e degeneração do miócito, desorganização do arranjo de miofibrilas, inchaço das mitocôndrias e danos em suas cristas. Esse estudo demonstrou que a encapsulação da DOX em lipossomas reduz significativamente a cardiotoxicidade do tratamento com doses iguais ou superiores ao que era usado na prática clínica para adultos e crianças. Logo, portanto, pode-se demonstrar um benefício clínico para os pacientes que se beneficiam do tratamento com doxorubicina.

Ainda nesse mesmo sentido, o estudo de Kanter e colaboradores (1993) compara o efeito cardiotóxico da DOX lipossomal e da DOX livre em cães. Nesse estudo são utilizados Beagles, machos e fêmeas. Todos os cachorros toleraram bem o tratamento. Todos aqueles que receberam DOX livre mostraram evidências de toxicidade cardíaca em comparação ao grupo da DOX lipossomal, onde não foi observada esta reação. Dentre os efeitos observados no grupo da DOX livre pode-se citar: vacuolização das fibras musculares dos ventrículos (direito e esquerdo) e a inversão da onda T. Esse estudo não explica o mecanismo pelo qual o miocárdio é protegido pela encapsulação da doxorubicina, mas demonstra a redução significativa da ocorrência de cardiotoxicidade na utilização da DOX lipossomal.

Com relação à ação vesicante do extravasamento de doxorubicina no local de aplicação, foi demonstrado por Forssen e Tokes (1983) e também por Balazsovits (1989) a ação preventiva do encapsulamento lipossomal sobre a indução de necrose pela doxorubicina. Os animais que receberam DOX lipossomal demonstraram resposta inflamatória e desconforto após administração subcutânea, mas não foi demonstrada ulceração. Já no grupo da doxorubicina livre foi demonstrada resposta inflamatória pronunciada e progressão à necrose, após a administração subcutânea.

Um estudo de toxicidade intravenosa de doses repetidas realizado em roedores com DOXIL[®] foi interrompido após oito doses, devido à alta taxa de mortalidade relacionada à toxicidade dérmica e problemas de saúde em geral dos animais. Efeitos tóxicos similares foram observados para DOXIL[®] e para o cloridrato de doxorubicina: diminuição do peso corporal, diminuição da quantidade de células brancas do sangue (leucócitos) e glóbulos

vermelhos (RBC), atrofia tímica e testicular, medula óssea hipocelular, vacuolização dos miócitos e degeneração do miocárdio. O DOXIL[®] foi menos mielotóxico, cardiotoxico e nefrotóxico do que o cloridrato de doxorubicina, porém mais dermatóxico (toxicidade dérmica reversível sob a forma de lesões nos pés e nas pernas). Um estudo realizado em espécie não roedora levou às mesmas conclusões. Em termos de toxicidade dérmica, a NOAEL foi de 0,25 mg/kg tanto em espécies roedoras quanto em não roedoras.

Dois estudos adicionais, um em espécie não roedora, foram realizados para avaliar a toxicidade cardíaca, hematológica e dérmica do DOXIL[®]. Em um modelo animal para avaliar a cardiotoxicidade da antraciclina, até 50% a mais de DOXIL[®] pode ser administrado, em comparação com a doxorubicina livre, sem incorrer em risco aumentado de cardiomiopatia. Em uma espécie não roedora, a gravidade das lesões dérmicas associadas ao DOXIL[®] foi relacionada com a dose e ao intervalo de dose, com doses mais baixas ou intervalos de tempo de administração mais longos, resultando em redução da gravidade da lesão.

A incidência de mielossupressão foi leve e aparentemente está confinada, principalmente, à série eritroide. As lesões dérmicas foram em geral um parâmetro limitador da dose mais importante do que a mielotoxicidade para DOXIL[®], o que não é o caso para o cloridrato de doxorubicina.

A genotoxicidade do DOXIL[®] como um produto acabado não foi avaliada; sendo a doxorubicina um poderoso mutagênico, teria mascarado qualquer resposta do placebo de lipossomas STEALTH[®]. Portanto, somente o potencial genotóxico dos lipossomas vazios foi avaliado na bateria convencional de ensaios (teste de Ames; teste em linfoma de camundongo L5178Y/TK^{+/-} *in vitro*; teste de indução de aberração cromossômica em células de ovários de hamster chinês; teste do micronúcleo em mamíferos *in vivo*). Os resultados obtidos nesses testes para o lipossoma STEALTH[®] vazio não demonstraram efeitos genotóxicos.

A avaliação da toxicidade reprodutiva foi realizada através de dois estudos: estudo de toxicidade no desenvolvimento embrio-fetal e potencial teratogênico (em ratos) e estudo de avaliação da dose relacionada às toxicidades de desenvolvimento embrio-fetal e potencial teratogênico (em coelhos). A administração de altas doses de DOXIL[®] para roedores grávidas foi associada com diminuição do peso fetal e retardo de ossificação fetal, efeitos comparáveis aos observados para a doxorubicina convencional. O estudo em coelhos mostrou efeitos tóxicos comparáveis entre o DOXIL[®] e a doxorubicina convencional. Entretanto esses efeitos não foram demonstrados quando analisou-se os lipossomas vazios, sugerindo que os efeitos observados seriam relativos a presença da doxorubicina nos lipossomas.

Um estudo de tolerância local, realizado em espécie não roedora recebendo DOXIL[®] por injeção IV, revelou ausência de intolerância no local da administração. No entanto, após administração subcutânea, reações inflamatórias dose-dependente foram observadas, indicando que o DOXIL[®] pode provocar resposta inflamatória após sua administração acidental perivenosa. Nem o DOXIL[®] nem os lipossomas "vazios" demonstraram qualquer potencial hemolítico em células vermelhas humanas ou qualquer coagulação ou precipitação de soro ou plasma humano.

A toxicidade de MPEG-DSPE, um dos três componentes lipídicos dos lipossomas STEALTH[®], foi avaliada apenas através de um único estudo de dose única, realizado em camundongos. Os resultados indicaram que o material não é significativamente tóxico.

Em conclusão, embora o DOXIL[®] e o cloridrato de doxorubicina apresentem um perfil de toxicidade semelhante, o DOXIL[®] está relacionado a uma maior incidência de lesões dérmicas, principalmente nos pés e pernas, enquanto o cloridrato de doxorubicina demonstra maior cardio e nefrotoxicidade. O perfil de toxicidade do DOXIL[®] tem sido bem definido com base na literatura disponível sobre o cloridrato de doxorubicina convencional e os resultados de estudos adequados realizados em relação à indicação e à população reivindicada.

5.6.6 Dados clínicos que embasam o desenvolvimento do DOXIL[®]

Corroborando com os resultados pré-clínicos, estão os dados de farmacocinética dos estudos clínicos em pacientes com câncer de próstata, mama, dentre outras malignidades refratárias, cujos resultados estão descritos na tabela 7. Nessa tabela faz-se a comparação entre os parâmetros farmacocinéticos analisados para a doxorubicina livre (convencional), o DOXIL[®] e a formulação lipossomal peguilada investigacional (PDL-1). Nesses estudos fica demonstrado que o encapsulamento da doxorubicina em lipossomas peguilados altera significativamente o padrão farmacocinético da doxorubicina. Pode-se analisar essa alteração tanto pela redução do clearance e do volume de distribuição, como pelo aumento do $t_{1/2}$ de distribuição e da área sob a curva concentração vs tempo.

Os lipossomas são retirados da circulação sanguínea pela ação dos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear, em especial no fígado e no baço. A adesão de opsoninas como o fragmento C3b do complemento, glicoproteínas β_2 I e da fração Fc das moléculas de

IgG são componentes críticos para o reconhecimento dos lipossomas pelos macrófagos (DRUMMOND *et al.*, 1999).

A formulação investigacional, PLD-1, difere do DOXIL[®], principalmente, pela concentração de sulfato de amônia encapsulado nos lipossomas durante a sua produção (150 e 250 mmol/L, respectivamente). Este componente é importante para manter a doxorrubicina dentro do lipossoma. Como pode ver-se nos resultados dos estudos de farmacocinética, o aumento da concentração de sulfato de amônia influenciou os parâmetros farmacocinéticos para a formulação do DOXIL[®] de forma favorável.

Cabe mencionar que nem todas as formulações “peguiladas” são semelhantes. Os componentes de cada formulação podem variar muito com relação ao tipo de lipídeo e suas diferentes combinações e concentrações. Essas diferenças podem refletir-se de forma diferente no perfil de eficácia e toxicidade das formulações.

Tabela 7: Comparação indireta dos parâmetros farmacocinéticos para PLD-1, DOXIL[®] e Doxorrubicina convencional (DOX Livre) em pacientes com tumores sólidos.

Dose (mg/m ²)	PLD-1		Câncer de Próstata: DOXIL [®]		Câncer de Mama: DOXIL [®]			Malignidade refratária: DOXIL [®]				DOX Livre
	25	50	45	60	45	60	70	30	40	50	60	60
V _{ss} (L)	4,1	5,9	4,6	4,9	3,5	4	3,5	1,6	1,7	1,6	1,7	~2000
t _{1/2α} (h)	3,2	1,4										0,2
t _{1/2β} (h)	45	46	74*	84*	86*	62*	80*	41*	70*	72*	72*	17-30
Cl (mL/min)	1,30	1,50	0,73	0,73	0,67	0,72	0,53	0,48	0,40	0,27	0,33	~1000
ASC (mg.h/L)	609	902	1891	2778	2005	2325	3724	1200	2808	3600	4272	~2
C _{max} (mg/L)	12,6	21,2	17,9	22,7	20,7	26,9	32,6	19,6	26,1	33,8	41,0	~5

V_{ss}: volume de distribuição no estado de equilíbrio estável; t_{1/2α} e t_{1/2β}: meias-vida inicial e secundária; Cl: clearance plasmático; ASC: área sob a curva concentração x tempo; C_{max}: concentração plasmática máxima;
 PLD-1: formulação investigacional de doxorrubicina lipossomal peguilada (diferente da disponível comercialmente)
 * Distribuição melhor representada por decaimento monoexponencial.

Fonte: Vail *et al.*, 2004.

Assim como para a avaliação pré-clínica, cabe relacionar esses dados com os dados de eficácia e toxicidade em humanos.

No estudo de Northfelt e colaboradores (1997) foi demonstrado que o tratamento com doxorrubicina lipossomal peguilada (DOXIL[®]) foi efetivo em pacientes com sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS (SK-AIDS), que tiveram progressão da doença ou toxicidade

inaceitável durante a primeira linha de tratamento. Além disso, demonstrou que os pacientes que sofreram progressão da doença, sob o regime de tratamento baseado em doxorubicina convencional, responderam, posteriormente, ao tratamento com o DOXIL[®]. Esse resultado sugere que a maior meia-vida plasmática, maior ASC e a alteração no padrão de distribuição do DOXIL[®] aumentam a utilidade clínica da doxorubicina. Nesse estudo, também pode-se observar não só um aumento na resposta ao tratamento, como também o benefício clínico para os pacientes, medido através de escalas validadas para analisar o desempenho dos pacientes, pela observação do uso de analgésicos e antidepressivos e pela redução das lesões e edemas.

Os estudos de Stewart e colaboradores (1998) e Northfelt e colaboradores (1998) demonstraram a eficácia do tratamento com DOXIL[®] como primeira linha no tratamento de pacientes com SK-AIDS grave.

O estudo de Stewart e colaboradores (1998) foi planejado para comparar a eficácia e a toxicidade do DOXIL[®] e da combinação de bleomicina e vincristina (BV). A resposta total para o regime com DOXIL[®] foi de 58%, significativamente mais alta que a resposta com o regime combinado BV, que foi de 23%. Além disso, pode-se mostrar uma diminuição no tempo para a resposta ao tratamento no grupo do DOXIL[®] (49 dias vs 57 dias).

O estudo de Northfelt e colaboradores (1998) demonstrou que o tratamento com DOXIL[®] foi significativamente superior à combinação de doxorubicina, bleomicina e vincristina (ABV). As respostas dos pacientes ao tratamento foram de 45,9% no grupo do DOXIL[®] e 24,8% no grupo da combinação ABV. Dessa forma, esses dados sugerem que o encapsulamento da doxorubicina no lipossoma peguilado aumenta o efeito terapêutico da doxorubicina. Apesar de não se saber ao certo o mecanismo para esse fato, acredita-se que está relacionado com o maior acúmulo de doxorubicina no local de ação quando formulada com lipossoma peguilado do que na forma convencional. Além disso, também muito importante, é o aumento da meia-vida de eliminação da doxorubicina de 1 hora (formulação convencional) para 55 horas (DOXIL[®]).

O estudo de Gordon e colaboradores (2001) demonstrou a equivalência do DOXIL[®] e da topotecana em relação aos critérios de eficácia (tempo livre de progressão, duração da resposta e sobrevida global) em pacientes com carcinoma de ovário recorrente. Nesse estudo pode-se ressaltar a importância da avaliação do perfil de toxicidade do tratamento para os pacientes. De forma geral, praticamente todos os pacientes tiveram eventos adversos e requereram modificações da dose administrada do tratamento. Porém, a incidência de eventos adversos grau 4 foi maior no grupo tratado com topotecan (71% vs 17%) em comparação com o grupo do DOXIL[®]. Os pacientes do grupo da topotecana também requereram mais alteração

de dose do que os do grupo do DOXIL[®] (78% vs 57%). Deve-se levar em consideração também a conveniência dos regimes de tratamento; como o regime de tratamento com DOXIL[®] requer menor frequência de administração do tratamento, esse é considerado mais conveniente para os pacientes.

O estudo de O'Brien e colaboradores (2004) demonstrou a não-inferioridade do tratamento com DOXIL[®] em comparação à doxorrubicina convencional para pacientes com carcinoma de mama metastático. A vantagem demonstrada com o uso do DOXIL[®] nesse estudo está relacionada ao seu perfil de toxicidade mais favorável, e, principalmente, à redução do risco de eventos adversos cardíacos, insuficiência cardíaca congestiva, menor toxicidade hematológica, menor incidência de náuseas, vômito e alopecia quando comparado ao tratamento com doxorrubicina convencional.

O estudo de Orłowski e colaboradores (2007) demonstrou a superioridade da combinação de bortezomibe e PLD quando comparada à monoterapia com bortezomibe no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo refratário. A combinação aumentou significativamente, o tempo médio para a progressão da doença quando comparada à monoterapia (9,3 vs 6,5 meses). Entretanto, o regime combinado está associado a um pior perfil de toxicidade, incluindo maior incidência de mielossupressão e toxicidades gastrintestinais e dermatológicas, dentre outras. Mesmo assim, considera-se que os benefícios da terapia combinada superam seus riscos para o paciente.

Os resultados de eficácia do DOXIL[®] nos estudos utilizados para embasar sua aprovação estão representados na tabela 8. Deve-se considerar que os critérios utilizados para avaliar a resposta dos pacientes nos diferentes estudos não são necessariamente os mesmos ou não estão descritos nos estudos. Portanto, esses dados devem ser analisados com cautela e foram incluídos somente para ilustrar a eficácia do tratamento com o DOXIL[®].

Tabela 8: Estudos de fase II e III com DOXIL[®]

Indicação	Produto	Dose (mg/m ²)	Esquema Posológico (semanas)	Resposta total (%)	Resposta Completa (%)	Duração da resposta (dias)
Sarcoma de Kaposi (n=16) ^a	DOXIL [®]	20	a cada 3	75	-	98
Sarcoma de Kaposi (n=34) ^b	DOXIL [®]	20	a cada 3	73,5	5,8	63
Sarcoma de Kaposi (n=53) ^c	DOXIL [®]	20	a cada 3	36	2	128
Carcinoma de	DOXIL [®]	40 – 50	a cada 3	25,7	2,9	180

Indicação	Produto	Dose (mg/m ²)	Esquema Posológico (semanas)	Resposta total (%)	Resposta Completa (%)	Duração da resposta (dias)
Ovário (n=35) ^d						
Carcinoma metastático de Mama (n=64) ^e	DOXIL [®]	45 – 60	3 - 4	31	6,3	270
Sarcoma de Kaposi (n=40) ^f	DOXIL [®]	20	a cada 3	70	-	-
Sarcoma de Kaposi (n=121) ^g	DOXIL [®]	20	a cada 3	58,7	5,8	160,4
	BV	15 IU/m ² , 2 mg	a cada 3	23,3	0,8	156,7
Sarcoma de Kaposi (n=133) ^h	DOXIL [®]	20	a cada 2	45,9	0,8	90
	ABV	20, 10, 1 mg	a cada 2	24,8		92
Carcinoma de Ovário (n=239) ⁱ	DOXIL [®]	50	a cada 4	19,7	3,8	112
	Topotecana	1,5 por dia (durante 5 dias)	a cada 3	17	4,7	119
Carcinoma de mama (n=254) ^j	DOXIL [®]	50	a cada 4	33	-	~207
	DOX livre	60	a cada 3	38	-	~234
Mieloma Múltiplo Refratário (n=324) ^k	PLD + Bortezomibe	30 1,3	Por ciclo Dias 1, 4, 8 e 11 de cada ciclo	44	4	311
	Bortezomibe	1,3	Dias 1, 4, 8 e 11 de cada ciclo	41	2	213

n - número de pacientes em tratamento com doxorubicina lipossomal peguilada; BV – combinação de bleomicina e vincristina; ABV – combinação de doxorubicina, bleomicina e vincristina; PLD – doxorubicina lipossomal peguilada; DOX livre – doxorubicina convencional.

Fontes: ^aSIMPSON *et al.*, 1993; ^bHARRISON *et al.*, 1995; ^cNORTHFELT *et al.*, 1997; ^dMUGGIA *et al.*, 1997; ^eRANSON *et al.*, 1997; ^fAMANTEA *et al.*, 1997; ^gSTEWART *et al.*, 1998; ^hNORTHFELT *et al.*, 1998; ⁱGORDON *et al.*, 2001; ^jO'BRIEN *et al.*, 2004; ^kORLOWSKI *et al.*, 2007.

Somando-se a esses resultados, é importante ressaltar a alteração do perfil de toxicidade obtido pela utilização da formulação lipossomal da doxorubicina. Essa alteração está intimamente relacionada ao perfil de farmacocinética discutido anteriormente. Nesse sentido, de acordo com os dados publicados por Alberts e Garcia (1997), em sua revisão sobre a segurança e tolerabilidade do uso de doxorubicina lipossomal peguilada em pacientes com tumores sólidos, os principais eventos adversos observados foram: eritrodisestesia palmoplantar (síndrome mão-pé), leucopenia, estomatite, alopecia, mucosite e náuseas e

vômitos. Nessa análise foram incluídos 308 pacientes de 12 estudos de fase I e II, que receberam doxorubicina lipossomal peguilada em doses variando de 10 a 80mg/m². A idade dos pacientes variou de 41 a 71 anos e 66% eram mulheres.

Sobre os efeitos cardíacos, Alberts e Garcia (1997) citam o estudo de fase I, onde 14 pacientes receberam doses cumulativas de doxorubicina lipossomal peguilada de $\geq 450\text{mg/m}^2$ sem demonstrarem redução significativa (>10%) na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ou falência cardíaca congestiva. Porém, esse dado deve ser interpretado com cuidado, pois ainda não se pode confirmar o risco real de cardiotoxicidade da doxorubicina lipossomal peguilada e, portanto, os pacientes continuam necessitando monitoramento da função cardíaca durante o tratamento.

O tratamento com lipossomas pode levar à ativação do sistema complemento principalmente pelas vias clássica e alternativa. Essa ativação leva à incidência de reações de hipersensibilidade conhecidas como reações pseudoalérgicas (CARPA). Essas reações ocorrem dentro de poucos minutos da exposição ao tratamento lipossomal. Dentre os sintomas estão o rubor, rash (erupção cutânea), dispnéia, dor no peito e nas costas e desconforto subjetivo. Dependendo das pré-medicações do paciente esses sintomas podem ocorrer mais tardiamente. A frequência de reação do tipo CARPA aos medicamentos lipossomais varia de 3% a 45% de acordo com o trabalho de Szebeni (1998; 2001). Dentre os fatores que estimulam essa ativação pode-se citar o tamanho dos lipossomas (maiores), polidispersão, carga de superfície positiva ou negativa e o elevado (> 45%) teor de colesterol, ao passo que o tamanho pequeno e uniforme e a neutralidade reduzem a propensão para ativação do sistema complemento. O risco de morte, embora muito baixo, pode ser aceitável no caso de doentes com câncer incurável, mas é intolerável em doenças não-terminais. Os estudos *in vitro* utilizados para a identificação desse tipo de reação geram resultados muito variáveis. As causas dessa variação têm sido discutidas e acredita-se que estejam relacionadas principalmente à falta de padronização das condições do teste. Dessa forma, seria interessante investir na padronização e validação desses testes para que se possa identificar com mais precisão a indução de CARPA por medicamentos lipossomais (SZE BENI, 2005).

Com relação às reações de hipersensibilidade, em pacientes com Sarcoma de Kaposi relacionado ao HIV, aproximadamente 7 a 9% desses pacientes desenvolvem hipersensibilidade após, principalmente, o primeiro ciclo de tratamento com doxorubicina lipossomal peguilada (ALBERTS; GARCIA, 1997).

O Quadro 6, abaixo, ilustra os benefícios toxicológicos da encapsulação da doxorubicina em lipossomas peguילים.

Quadro 6: Toxicidade comparativa da doxorubicina convencional e lipossomal. Fonte: DRUMMOND *et al.*, 1999.

Doxorrubicina convencional	Efeito comparativo da formulação lipossomal
Toxicidade Cardíaca	Reduzida
Mielossupressão	Reduzida
Mucosite	Levemente aumentada
Alopécia	Reduzida
Necrose tecidual após extravasamento do medicamento	Reduzida
Náuseas e vômito	Reduzida
Síndrome mão-pé (somente em infusão contínua)	Aumentada

Com relação à incidência de eventos adversos (EA), pode-se notar que a formulação lipossomal peguילה demonstra um perfil de toxicidade interessante em comparação com a formulação convencional da doxorubicina, sendo a redução da incidência de cardiotoxicidade o maior benefício para o paciente e o aumento da incidência de eritrodissiestesia palmo-plantar (síndrome mão-pé) a sua pior característica. Porém, deve-se levar em consideração que a síndrome mão-pé não é um EA que cause preocupação com relação ao risco de morte para o paciente e, além disso, é reversível. Em relação à cardiotoxicidade, apesar do DOXIL[®] ter demonstrado menor incidência de eventos cardíacos quando comparado à doxorubicina convencional, provavelmente por sua incapacidade de atravessar a barreira de células do endotélio cardíaco, sua bula segue fazendo referência ao monitoramento da função cardíaca em caso de doses superiores a 450mg/m². Ainda sobre a toxicidade cardíaca, vale lembrar o benefício de se reduzir essa toxicidade para o paciente, pois se trata de um EA que pode colocar a vida do paciente em risco. Outros EAs relatados para o DOXIL[®] foram: alopecia, mielossupressão, náuseas, vômitos, mucosite e estomatite. A mielossupressão pode ser parcialmente controlada pela adição de um agente estimulador de colônia para medula óssea (GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012; DRUMMOND *et al.*, 1999).

O DOXIL[®], formulação lipossomal do cloridrato de doxorubicina, foi desenvolvido, principalmente, para melhorar o perfil toxicológico da doxorubicina, quimioterápico com

comprovada eficácia no tratamento de diversas neoplasias. De acordo com os dados farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos demonstrados acima, pode-se concluir que a nova formulação atingiu os seus objetivos. Como o princípio ativo já tinha seu perfil toxicológico bem estabelecido e os lipossomas peguilados não demonstraram incrementar o perfil de toxicidade da nova formulação, os estudos apresentados foram considerados suficientes para a avaliação do seu perfil toxicológico pelas agências regulatórias.

Entretanto, com base no exposto anteriormente sobre as limitações dos testes toxicológicos para a avaliação de nanomateriais, por uma perspectiva estritamente científica, não se poderia considerar essa bateria de testes adequada para a elaboração do perfil de segurança do DOXIL[®]. No entanto, como o produto já está no mercado há quase 20 anos, pode-se analisar seus dados de farmacovigilância pós-comercialização. Analisando-se os relatos de toxicidade disponíveis para os cenários pré-clínico, clínico e pós-comercialização da doxorubicina lipossomal (Quadro 7) e da formulação convencional (Quadro 8) pode-se notar uma aparente baixa correlação entre esses dados. Deve-se levar em consideração que estes dados não foram coletados de forma a serem comparados diretamente entre diferentes medicamentos, pois os critérios utilizados para o relato dos eventos adversos não foram, necessariamente, os mesmos.

Esses dados podem ilustrar algumas considerações sobre os testes toxicológicos utilizados atualmente. Entre essas análises estaria a discussão sobre um melhor direcionamento da bateria de testes toxicológicos para as diferentes necessidades dos medicamentos. Como pode-se notar, alguns dos desfechos que mostram grande impacto pós-comercialização não tiveram dados pré-clínicos ou clínicos coletados pelo Pharmapendium. Além disso, pode-se ver uma incidência elevada de eventos cardíacos. Pode-se argumentar se esse dado estaria relacionado realmente a uma característica da formulação lipossomal ou da instabilidade do nanossistema que acaba por liberar a doxorubicina livre na circulação sanguínea. O segundo caso não deixaria de ser um evento importante para a formulação lipossomal, mas seria muito mais importante para entender a importância de se garantir a qualidade dos nanomedicamentos durante o seu processo de fabricação, armazenamento, dispensação e administração. Outro dado importante é a educação do profissional de saúde que administra nanomedicamentos, pois, analisando-se as diferenças na incidência de alterações no local de administração e perturbações gerais entre os diferentes cenários, nota-se uma elevação dos casos quando se considera o cenário pós-comercialização. Outro item que é digno de reflexão é a incidência de infecções e infestações. Mais uma vez seria possível

questionar se testes toxicológicos voltados para a avaliação dos impactos dos medicamentos no sistema imunológico são suficientes para avaliar o quanto o sistema imunológico dos pacientes fica debilitado, permitindo esse maior número de infecções e infestações. Essas são algumas reflexões que não pretendem chegar a nenhuma conclusão, mas têm por objetivo estimular a reflexão sobre temas tão importantes para o desenvolvimento seguro dos medicamentos.

Quadro 7: Número de observações toxicológicas para doxorrubicina lipossomal.

Disfunção	Dados Pré-clínicos	Dados Clínicos	Relatos Pós-Comercialização
Sanguínea e linfática	2	126	1917
Cardíaca	2	61	1111
Congênita e genética	1	1	53
Afecções do ouvido e do labirinto	sem dado	4	52
Endócrina	sem dado	sem dado	46
Ocular	sem dado	21	139
Gastrointestinal	1	220	1804
Perturbações gerais e alterações no local de administração	1	167	2686
Hepatobiliar	sem dado	17	414
Sistema imunológico	sem dado	15	266
Infecções e infestações	sem dado	111	2034
Metabólica e nutrição	sem dado	66	675
Tecido músculo-esquelético e conectivo	sem dado	37	590
Mutagenicidade	1	sem dado	sem dado
Neoplasias benigna, maligna e não especificada (incluindo cistos e pólipos)	sem dado	8	1480
Sistema Nervoso	sem dado	83	1375
Gravidez, no puerpério e perinatais	3	2	149
Psiquiátricas	sem dado	27	324
Sistema renal e urinário	sem dado	23	538
Sistema reprodutivo e de mama	6	13	86
Respiratória, torácica e mediastinal	sem dado	63	1822
Pele e subcutânea	sem dado	170	1215
Vascular	sem dado	46	825

* Os números dessa tabela não são destinados à comparação direta de diferentes medicamentos. Os dados pré-clínicos e clínicos foram extraídos pelo PharmaPendium da literatura, do banco de dados do

FDA e da EMA e das bases de dados *Mosby Consult* e *Meyler*. Os relatos pós-comercialização são referentes ao número de eventos adversos arquivados no banco de dados do FDA (AERS). Fonte: PHARMAPENDIUM, Doxorubicin Liposomal.

Quadro 8: Número de observações toxicológicas para doxorubicina convencional.

Disfunção	Dados Pré-clínicos	Dados Clínicos	Relatos Pós-Comercialização
Sanguínea e linfática	34	8	2134
Cardíaca	246	5	1145
Congênita e genética	19	sem dado	73
Afecções do ouvido e do labirinto	2	sem dado	65
Endócrina	2	sem dado	56
Ocular	1	10	127
Gastrointestinal	18	22	1765
Perturbações gerais e alterações no local de administração	87	14	2410
Hepatobiliar	38	sem dado	430
Sistema imunológico	2	1	190
Infecções e infestações	sem dado	5	2207
Metabólica e nutrição	49	6	680
Tecido músculo-esquelético e conectivo	8	sem dado	555
Mutagenicidade	92	1	no data
Neoplasias benigna, maligna e não especificada (incluindo cistos e pólipos)	3	sem dado	1409
Sistema Nervoso	11	2	1308
Gravidez, no puerpério e perinatais	16	sem dado	192
Psiquiátricas	12	sem dado	280
Sistema renal e urinário	69	sem dado	535
Sistema reprodutivo e de mama	28	4	87
Respiratória, torácica e mediastinal	14	sem dado	1612
Pele e subcutânea	16	15	815
Vascular	7	2	707

* Números dessa tabela não são destinados à comparação direta de diferentes medicamentos. Os dados pré-clínicos e clínicos foram extraídos pelo PharmaPendium da literatura, do banco de dados do FDA e da EMA e das bases de dados *Mosby Consult* e *Meyler*. Os relatos pós-comercialização são referentes ao número de eventos adversos arquivados no banco de dados do FDA (AERS). Fonte: PHARMAPENDIUM, Doxorubicin Hydrochloride.

5.7 Discussão geral e sugestões para incremento da regulamentação do setor

Como princípio fundamental para essa discussão, ressalta-se a amplitude do tema abordado, não só em termos de conteúdo, mas também na dinâmica requerida para estudos na área da nanotecnologia. Além de requerer trabalho e conhecimento transdisciplinar, ainda está no início de sua estruturação e, por isso, apesar da disponibilidade de muitos artigos científicos sobre o tema, não se pode contar com padronização na abordagem científica que possibilite adequada comparação e, por consequência, conclusões confiáveis em todos os aspectos abordados.

Com a crescente preocupação em relação à criação de bases de dados para registro das novas informações e com a padronização dos termos e testes utilizados nessa área, pode-se esperar um maior avanço na transformação dos dados em informação e, por sua vez, em conhecimento e, mais à frente, em sabedoria. Somente assim será possível aplicar o conhecimento para a tomada de decisões que realmente podem impactar sobre os efeitos dessa nova tecnologia para a saúde da sociedade.

Sabe-se que existem vários benefícios que embasam o uso de nanossistemas como carreadores de fármacos (PARVEEN *et al.*, 2012). As propriedades bio-físico-químicas exclusivas dos nanomateriais podem ser manipuladas para aumentar o tempo de meia-vida do medicamento na circulação sanguínea, que, por sua vez, pode levar a um maior acúmulo de fármaco no local de ação (tecido tumoral). A associação de moléculas direcionadoras ao sistema de entrega de fármacos pode aumentar ainda mais a seletividade da nanoterapia ao tecido tumoral. O desenvolvimento de técnicas de encapsulamento de fármacos pode melhorar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, eliminando da formulação, assim, os solventes orgânicos que são muito prejudiciais à saúde. A quantidade de fármaco na formulação pode ser aumentada, devido à grande proporção superfície-volume do nanossistema. Além disso, os nanossistemas podem ser projetados para serem multifuncionais, incluindo em um mesmo dispositivo um sistema de direcionamento, fármaco e sistema de diagnóstico (por imagem ou sensor bioquímico), que permite o monitoramento da eficácia terapêutica (KUMAR; DHYANI; KOTHIYAL, 2013).

Tendo em vista toda a informação compilada e discutida, seguem abaixo algumas recomendações importantes para a regulamentação dessa tecnologia no Brasil:

- (1) Presença mais enfática e participativa nos grupos de trabalho internacionais que estão validando os testes toxicológicos para os nanomateriais.
- (2) Melhor controle sobre o andamento e publicação dos resultados gerados nas pesquisas sobre nanotoxicologia patrocinadas pelos programas do governo federal.
- (3) Investir em treinamento adequado aos membros da agência para assegurar que as análises regulatórias desses novos produtos sejam realizadas com a profundidade e tempo adequado para garantir a competitividade do Brasil na área de nanomedicamentos, mas também o direito da população em relação a sua segurança e informação.
- (4) Implementar procedimento para garantir a rotulagem adequada de medicamentos contendo nanomateriais. Não é necessário que seja através de regulamentação específica para nanotecnologia e nem através de um símbolo, como no caso dos transgênicos, mas que se possa garantir que os rótulos e bulas dos medicamentos incluam informação suficiente para que o direito a informação e decisão da população seja preservado.
- (5) Melhorar o plano de comunicação da ANVISA sobre as suas ações e posicionamento em relação à regulamentação de nanomedicamentos.
- (6) Assegurar que os investimentos do governo federal destinados à pesquisa e desenvolvimento na área de nanotecnologia sejam alocados para a geração de conhecimento na área dos testes pré-clínicos necessários para:
 - a. avaliar a segurança e eficácia dos nanomateriais;
 - b. obter dados sobre os impactos dos nanomateriais na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos convencionais;
 - c. obter dados para entender melhor a relação estrutura-atividade desses novos materiais.
- (7) Com relação à adaptação dos testes toxicológicos solicitados:
 - a. Que o conjunto mínimo de testes solicitado seja constantemente alinhado com os guias internacionais.

- b. Adicionalmente, deveria adicionar o teste do Cometa para a avaliação do potencial genotóxico de nanomedicamento. A OCDE já está preparando seu guia para esse teste.
- (8) Com relação à submissão regulatória, adicionalmente ao processo convencional, deveriam ser exigidas, no mínimo, as seguintes informações:
- a. Caracterização bio-físico-química apropriada do nanomedicamento, levando-se em consideração os possíveis fatores que podem influenciar essa análise (meios, diferentes condições de exposição, potencial de agregação e aglomeração, resíduos de fabricação, estabilidade da formulação, ligantes de superfície, possíveis interações com os procedimentos de caracterização).
 - b. Assegurar que exista um racional, mencionando especificamente as características nanotecnológicas que podem impactar na seleção dos testes para a avaliação pré-clínica dos nanomedicamentos (linhagem celular escolhida, modelo de cultivo celular, desfechos analisados, tempo de exposição do teste, etc.), assim como uma explicação para cada adaptação feita aos testes, buscando alinhamento com as metodologias publicadas/disponíveis, quando for possível. Se não for possível, registrar o racional da adaptação.
 - c. Racional para a escolha dos materiais de referência para os testes toxicológicos.
- (9) Inclusão de todos os dados dos nanomedicamentos em uma base de dados destinada para essa finalidade.

Dado que a nanotecnologia é abrangente em seu alcance e interdisciplinar por natureza, garantir a participação no seu desenvolvimento dos atores envolvidos na sua aplicação e regulação faz-se essencial para melhorar a capacitação técnica nessa área, diminuir a assimetria de informação e agilizar o processo de incorporação de conhecimento no país.

O início tardio da revisão da regulamentação para nanomedicamentos no Brasil, quando comparado ao FDA e EMA, pode ser aproveitado de forma bastante positiva. Tendo em vista todas as informações que já estão disponíveis, os grupos de trabalho já estabelecidos e a experiência dos países que já implementaram alguma ação no sentido de regulamentar a aprovação dos nanomedicamentos, espera-se que a velocidade de desenvolvimento da

ANVISA nessa área seja rápida e que em pouco tempo possa estar bem estabelecida e gerando resultados.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este estudo que os testes toxicológicos preconizados atualmente pelas agências reguladoras dos Estados Unidos da América, União Europeia e no Brasil, apesar de estarem alinhados, não são específicos para a avaliação de nanomedicamentos. Nesse sentido, em base às informações disponíveis, não se pode garantir que os dados gerados pela bateria de testes solicitada sejam confiáveis para o estabelecimento de uma relação risco/benefício robusta para os nanomedicamentos. Além disso, restam demonstradas muitas das limitações desses testes e algumas sugestões de melhorias para a condução dos mesmos. Entretanto, esse processo “caseiro” de adaptação dos testes, que deveriam ser “padronizados”, acarreta em distorção dos resultados obtidos e, por consequência, dificulta o entendimento e a correlação dos dados gerados com os disponíveis na literatura, apesar de ser de grande utilidade para a adequação dos guias disponíveis.

Ainda nesse sentido, ressalta-se a importância da caracterização bio-físico-química de cada nanomedicamento submetido às análises, pois, como demonstrado, uma das maiores dificuldades enfrentadas é o alinhamento entre as definições utilizadas por cada grupo de pesquisa para a classificação de seus nanomateriais – que também impacta negativamente no processo de compilação de dados para geração de evidências. Levando-se em consideração as sugestões elaboradas no presente trabalho acredita-se que o processo de avaliação regulatória dos nanomedicamentos seja fortalecido.

Com relação à bateria de testes toxicológicos solicitados para as formulações convencional e lipossomal (DOXIL[®]) da doxorubicina, pode-se ver que seguiram as recomendações das agências reguladoras e, portanto, estavam alinhados. Entretanto, à luz das limitações dos testes toxicológicos compiladas nesse trabalho, pode-se concluir que a bateria de testes realizada para a avaliação do DOXIL[®] não foi adequada para o estabelecimento de seu perfil de segurança. Todavia, como o produto está completando quase 20 anos no mercado e possui, além dos dados pré-clínicos e clínicos, também os de pós-comercialização, pode-se notar que seu perfil de toxicidade está bem estabelecido e que manteve alinhamento com os resultados obtidos durante o seu desenvolvimento. Não se pode, entretanto, extrapolar este mesmo comportamento para outros casos, os quais deverão seguir normativas atualizadas.

REFERÊNCIAS

AAM, B. B.; FONNUM, F. Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. **Arch. Toxicol.**, v. 81, n. 6, p. 441-446, jun. 2007.

ADRIBLASTINA: cloridrato de doxorrubicina. São Paulo: Laboratórios Pfizer LTDA. 2013. Bula de remédio. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/arquivoPdf/AdriblastinaRD_PS.pdf>. Acesso em: 26 jan 2014.

ABDI. AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Brasília: ABDI. 2010.

AGÊNCIA GESTÃO CT&I. Audiência pública sobre rotulagem de produtos com nanotecnologia gera polêmica. Agência Gestão CT&I, 21 nov. 2013. Disponível em: <http://www.agenciacti.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=4856:audiencia-publica-sobre-rotulagem-de-produtos-com-nanotecnologia-gera-polemica&catid=1:latest-news>. Acesso em: 24 mar 2014.

AKHTER, S. et al. Nanomedicines as Cancer Therapeutics: Current Status. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 362-378, maio 2013.

ALBERTS, D. S.; GARCIA, D. J. Safety aspects of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cancer. **Drugs**, v. 54, s. 4, p. 30-35, 1997.

ALBRECHT, C. et al. Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersions of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. **Toxicol. In Vitro**, v. 23, n. 3, p. 520-530, abr. 2009.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 36-48, jan. 2013

AMANTEA, M. et al. Relationship of dose intensity to the induction of palmar-plantar erythrodysesthesia by pegylated liposomal doxorubicin in dogs. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 18, n. 1, p. 17-26, jan. 1999.

AMARA-MOKRANE, Y. A. et al. Protective effects of alpha-hedrin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 11, n. 2, p. 161-167, mar. 1996.

ANDERSON, R. D.; NATHAN, A. B. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutat. Res.**, v. 309, n. 1, p. 109-142, 1 ago. 1994.

ARORA, P. et al. Nano-regenerative medicine towards clinical outcome of stem cell and tissue engineering in humans. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 16, n. 9, p. 1991-2000, set. 2012.

ARTS, J. H. E. et al. A critical appraisal of existing concepts for the grouping of nanomaterials. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 70, n. 2, p. 492-506, 2014.

BAEK, M. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 7, p. 3081-3097, 2012.

BALAZSOVITS, J. A. et al. Analysis of the effect of liposome encapsulation on the vesicant properties, acute and cardiac toxicities, and antitumor efficacy of doxorubicin. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 23, n. 2, p. 81-86, 1989.

BANGHAM, A. D. Physical Structure and Behavior of Lipids and Lipid Enzymes. **Adv. Lipid. Res.**, v. 1, p. 65-104, 1963.

BARENHOLZ, Y. Doxil[®]--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **J. Control Release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 10 jun. 2012.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 167-179, abr-jun. 2007.

BAUMANN, J. et al. Adaptation of the Daphnia sp. acute toxicity test: miniaturization and prolongation for the testing of nanomaterials. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 21, n. 3, p. 2201-2213, fev, 2014.

BERHANU, D. et al. Characterisation of carbon nanotubes in the context of toxicity studies. **Environ. Health**, v. 8, s. 1, p. S3, 21 dez. 2009.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning Tunneling Microscopy—from Birth to Adolescence (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 26, n. 7, p. 606-614, jul. 1987a.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence. **Rev. Mod. Phys.**, v. 59, n. 3, p. 615-625, jul. 1987b.

BORZELLECA, J. F. Paracelsus: herald of modern toxicology. **Toxicol. Sci.**, v. 53, n. 1, p. 2-4, jan. 2000.

BOUCHER, R.; LIVINGSTON, G. K.; QUE HEE, S. S. In vitro micronucleus bioassay of human peripheral lymphocytes for adriamycin in the presence of cyclophosphamide and urines of patients administered anticancer drugs. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 21, n. 4, p. 372-382, 1993.

BOWMAN, D. M.; HODGE, G. A. Nanotechnology: Mapping the wild regulatory frontier. **Futures**, v. 38, n. 9, p. 1060-1073, nov. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 31 jan. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos++vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 24 mar 2014.

BRASIL. Projeto de Lei n. 131 de 12 de maio 2010. Altera o Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que institui normas básicas sobre alimentos, e a Lei nº 6.360, de 23 de

setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências, para determinar que rótulos, embalagens, etiquetas, bulas e materiais publicitários de produtos elaborados com recurso à nanotecnologia contenham informação sobre esse fato. 12 maio 2010. Disponível em: <http://www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes.asp?p_cod_mate=96840>. Acesso em: 24 mar 2014.

BRASIL. Projeto de Lei n. 5076 de 18 de abril de 2005. Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País, cria Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança - CTNano, institui Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia - FDNano, e dá outras providências. 18 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=282392>>. Acesso em: 24 mar 2014.

BRASIL. Projeto de Lei n. 5133 de 13 de março de 2013. Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia. 13 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257>>. Acesso em: 24 mar 2014.

BRASIL. Projeto de Lei n. 6741 de 11 de novembro de 2013. Dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país, e dá outras providências. 11 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=600333>>. Acesso em: 24 mar 2014.

BRASIL. Protocolo de Estabelecimento do Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia (CBAN) entre os Governos da República Federativa do Brasil e da República Argentina. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2005. Seção 1, n. 247, p. 82. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/893014/pg-82-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-26-12-2005>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BREGOLI, L. et al. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 2, p. 121–129, 3 ago. 2009.

BUENO-DE-MESQUISTA, J. M. et al. Additional value and potential use of the 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer in daily clinical practice. **Ann. Oncol.**, v. 22, n. 9, p. 2021-2030, set. 2011.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases.**, v. 2, n. 4, p. 17-71, dez. 2007.

CALLAHAN, S. Nanotechnology in a New Era of Strategic Competition. JFQ. 2000. Disponível em: <<http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a525588.pdf>>. Acesso em: 05 jul 2014.

CAMBI, A. et al. Meeting report--Visualizing signaling nanoplatfoms at a higher spatiotemporal resolution. **J. Cell Sci.**, v. 126, p. 3817-3821, set. 2013.

CAMPAGNOLO, L. et al. Physico-Chemical Properties Mediating Reproductive and Developmental Toxicity of Engineered Nanomaterials. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, n. 26, p. 4488-4494, 2012.

CANELAS, D. A.; HERLIHY, K. P.; DESIMONE, J. M. Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 1, n. 4, p. 391-404, jul-ago. 2009.

CARRIGY, N. B. et al. Pediatric In Vitro And In Silico Models Of Deposition Via Oral And Nasal Inhalation. **J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.**, v. 27, n. 3, p. 149-169, 2014.

CASEY, A. et al. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1425-1432, jun. 2007.

CEDERVALL, T. et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, 13 fev. 2007a.

CEDERVALL, T. et al. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 46, n. 30, p. 5754-5756, jul. 2007b.

CHARI, R. V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, n. 1, p. 98-107, jan. 2008.

CHENG, T. C. et al. Sensitivity of PEGylated Interferon Detection by Anti-Polyethylene Glycol (PEG) Antibodies Depends on PEG Length. **Bioconjug. Chem.**, 5 ago. 2013.

CHERTOK, B. et al. Drug delivery interfaces in the 21st century: from science fiction ideas to viable technologies. **Mol. Pharm.**, v. 10, n. 10, p. 3531-3543, 7 out. 2013.

CHO, W. S. et al. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. **Toxicol. Sci.**, v. 126, n. 2, p. 469-477, abr. 2012.

CHORILLI, M. et al. Estudo da Estabilidade de Lipossomas Compostos de Fosfatidilcolina de Soja e Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada Adicionados ou Não de Colesterol por Método Turbidimétrico. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2007.

CNRS. **Precision Drugs**. Disponível em: <<http://www2.cnrs.fr/en/1668.htm>>. Acesso em: 05 jul 2014.

COIMBRA, M. et al. Critical factors in the development of tumor-targeted anti-inflammatory nanomedicines. **J. Control. Release**, v. 160, n. 2, p. 232-238, 10 jun. 2012.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutat. Res.**, v. 759, p. 27-39, jan-mar. 2014.

COLLINS, F. S.; GRAY, G. M.; BUCHER, J. R. Transforming environmental health protection. **Science**, v. 319, p. 906-907, 2008.

COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chem. Ind.**, v. 24, p. 950-954, 12 dez. 1992.

CONSUMER PRODUCTS INVENTORY. **An inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market.** 2013. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/cpi/>>. Acesso em: 18 abr 2013.

CORSI, F. et al. HER2 expression in breast cancer cells is downregulated upon active targeting by antibody-engineered multifunctional nanoparticles in mice. **ACS Nano**, v. 5, n. 8, p. 6383-6393, 23 ago. 2011.

CRIST, R. M. et al. Common pitfalls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. **Integr. Biol. (Camb.)**, v. 5, n. 1, p. 66-73, jan. 2013.

CUI, W. et al. Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth. **Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p. 46-53, jan. 2012.

DAVIS, R. R. et al. In vitro biological effects of sodium titanate materials. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 83, n. 2, p. 505-511, nov. 2007.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 7, n. 9, p. 771-782, set. 2008.

DE ZWART, L. L. et al. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 39, n. 3, p. 282-309, Jun 2004.

DEAMER, D. W. From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. **FASEB J.** v. 24, n. 5, p. 1308-1310, maio 2010.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Current challenges in toxicological research: Evaluation of the developmental toxicity of manufactured nanomaterials. **Vig. Sanit. Debate**, v. 1, n. 4, p. 11-24, 2013.

DESAI, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. **AAPS J.**, v. 14, n. 2, p. 282-295, jun. 2012.

DHAWAN, A. et al. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 18, n. 6, p. 487-490, nov. 2003.

DING, H. et al. Bioconjugated PLGA-4-arm-PEG branched polymeric nanoparticles as novel tumor targeting carriers. **Nanotechnology**, v. 22, n. 16, p. 165101, 22 abr. 2011.

DOAK, S. H. et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 285-293, jul. 2009.

DOAK, S. H. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutat. Res.**, v. 745, n. 1-2, p. 104-111, 14 jun. 2012.

DOANE, T. L.; BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2885-2911, 7 abr. 2012.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Mol. Pharm.**, v. 5, n. 4, p. 487-495, jul-ago. 2008.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nat. Nanotechnol.**, v. 2, n. 8, p. 469-478, ago. 2007.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occup. Environ. Med.**, v. 61, n. 9, p. 727-728, set. 2004.

DONALDSON, K.; POLAND, C. A.; SCHINS, R. P. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 4, p. 414-420, dez. 2010.

DONALDSON, K.; TRAN, C. L.; MACNEE, W. Deposition and effects of fine and ultrafine particles in the respiratory tract. **The European Respiratory Monograph**, v. 7, p. 77-92, 2002.

DOXORUBICIN. **PubChem Compound**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=31703#itabs-3d>>. Acesso em: 06 abr 2014.

DREXLER, K. E. **Engines of creation: the coming era of nanotechnology**. 1. ed. New York: Doubleday, 1986.

DRUMMOND, D. C.; MEYER, O.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PAPAHADJOPOULOS, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, n. 4, p. 691-743, dez. 1999.

DUNCAN, R. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n. 4, p. 492-501, ago. 2011.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1421-1431, 28 fev. 2006.

EIFLER, A. C.; THAXTON, C. S. Nanoparticle Therapeutics: FDA Approval, Clinical Trials, Regulatory Pathways, and Case Study. **Methods Mol. Biol.**, v. 726, p. 325-338, 2011.

ELBAKRY, A. et al. Layer-by-layer coated gold nanoparticles: size-dependent delivery of DNA into cells. **Small**, v. 8, n. 24, p. 3847-3856, 21 dez. 2012.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 2, p. 129-137, fev. 2012.

ERNSTING, M. J. et al. Preclinical pharmacokinetic, biodistribution, and anti-cancer efficacy studies of a docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle in mouse models. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1445-1454, fev. 2012.

EUROPEAN MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Nanomedicine - ESF Forward Look on Nanomedicine 2005**. France: European Science Foundation, 2005. 48 p.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Caelyx - EMEA/H/C/000089 -II/0066. 2013a. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000089/human_med_000683.jsp&mid=WC0b01ac058001d124>. Acesso em: 26 jan 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EPAR summary for the public – Caelyx – doxorubicin hydrochloride. 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000089/WC500020173.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on Safety and Efficacy Follow-Up - Risk Management of Advanced Therapy Medicinal Products. London, 2008. 22 p. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500006326.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. jun. 2012. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/12/WC500119604.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medical Products for Human Use. London, 2006. 4 p. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2010/01/WC500069728.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Reflection paper on non clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications. London, 2011. 5 p. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105048.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. London, 2013b. 13p. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Scientific Discussion – Caelix. p. 1-22, 2005. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000089/WC500020175.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **EPA Risk Assessment - Glossary**. 2014. Disponível em: <http://www.epa.gov/risk_assessment/glossary.htm>. Acesso em: 28 out. 2014.

FADEEL, B.; GARCIA-BENNET, A. E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 362-374, mar. 2010.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drugs Evaluation Research. **Manual of Policies and Procedures - Reporting Format for Nanotechnology-Related Information in CMC Review**. Maryland: Office of Pharmaceutical Science, 2010. 11 p.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Guidance for Industry - Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives**. Maryland: Office of Food Additive Safety, 2012a. 26 p.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **2013 Nanotechnology Regulatory Science Research Plan**. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm273325.htm>>. Acesso em: 06 abr 2014.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. **Approval package for NDA 50-718/S-019 – Doxil**. 27 out. 2004. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/050718Orig1s019.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. **NDA 50-718. Doxil - Division Director Summary Review**. jun. 2008. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/summary_review/2008/050718se7-033_SUMR.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research; Center for Biologics Evaluation and Research. **Guidance for Industry. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use**. jun. 2012b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm074931.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Doxil® (doxorubicin HCl liposome injection)**. 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0209/06P-0209-EC15-Attach-1.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology.** 2011. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm257926.htm>>.

Acesso em: 24 mar 2014.

FENSKE, D. B.; CULLIS, P. R. Liposomal nanomedicines. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 5, n. 1, p. 25-44, jan. 2008.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, mar. 2005.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom - An Invitation to Enter a New Field of Physics. **Engineering and Science**, p. 22-36, fev. 1960.

FLEISCHER, T.; JAHNEL, J.; SEITZ, S. B. NanoSafety - Risk Governance of Manufactured Nanoparticles - FINAL REPORT. Brussels: STOA, 2012. Disponível em: <[http://www.ta-swiss.ch/?redirect=getfile.php&cmd\[getfile\]\[uid\]=2094](http://www.ta-swiss.ch/?redirect=getfile.php&cmd[getfile][uid]=2094)>. Acesso em: 24 mar 2014.

FORSSEN, E. A.; TÖKÈS, Z. A. Attenuation of dermal toxicity of doxorubicin by liposome encapsulation. **Cancer Treat. Rep.**, v. 67, n. 5, p. 481-484. maio 1983.

FORSSEN, E. A.; TÖKÈS, Z. A. Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 3, p. 1873-1877, mar. 1981.

FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**, v. 64, p. 221-253, 2000.

FREI, E. 3RD. et al. The relationship between high-dose treatment and combination chemotherapy: the concept of summation dose intensity. **Clin. Cancer. Res.**, v. 4, n. 9, p. 2027-2037, set. 1998.

FRIEDMAN, A.; CLAYPOOL, S.; LIU, R. The Smart Targeting of Nanoparticles. **Curr. Pharm. Des.**, v. 19, n. 35, p. 6315-6329, 2013.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 4795-4822, 2014.

GABIZON, A.; MARTIN, F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. **Drugs**, v. 54, s. 4, p. 15-21, 1997.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GREINER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 45, n. 4, p. 388-398, mar. 2012.

GAO, H. et al. Incorporation of lapatinib into lipoprotein-like nanoparticles with enhanced water solubility and anti-tumor effect in breast cancer. **Nanomedicine (Lond.)**, v. 8, n. 9, p. 1429-1442, set. 2013.

GARAY, R. P. et al. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. **Expert. Opin. Drug. Deliv.**, v. 9, n. 11, p. 1319-1323, nov. 2012.

GASSER, M. et al. The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry. **J. Nanobiotechnology**, v. 8, n. 1, p. 31, dez. 2010.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, n. 7, p. 727-741, 1 abr. 1999.

GHADERI, S.; RAMESH, B.; SEIFALIAN, A. M. Fluorescence nanoparticles "quantum dots" as drug delivery system and their toxicity: a review. **J. Drug Target.**, v. 19, n. 7, p. 475-486, ago. 2011.

GISSELSSON, D. Intratumor diversity and clonal evolution in cancer--a skeptical standpoint. **Adv. Cancer Res.**, v. 112, p. 1-9, 2011.

GLOBOCAN. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em: 1 mar 2014.

GODUGU, C. et al. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53708, 2013.

GOLDBERG, M. S. et al. Biotargeted nanomedicines for cancer: six tenets before you begin. **Nanomedicine (Lond)**, v. 8, n. 2, p. 299-308, fev. 2013.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 21-28, 20 nov. 2000.

GONZALEZ, L.; SANDERSON, B. J.; KIRSCH-VOLDERS, M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 185-191, jan. 2011.

GORDON, A. N. et al. Recurrent Epithelial Ovarian Carcinoma: A randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. **J. Clin. Oncol.**, v. 19, n. 14, p. 3312-3322, 15 jul. 2001.

GREEN, D. M. et al. Congenital Anomalies in Children of Patients Who Received Chemotherapy for Cancer in Childhood and Adolescence. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 3, p. 141-146, 18 jul. 1991.

GREEN, D. M. Fertility and Pregnancy Outcome after Treatment for Cancer in Childhood or Adolescence. **Oncologist**, v. 2, n. 3, p. 171-179, 1997.

GREEN, H. et al. Pegylated liposomal doxorubicin as first-line monotherapy in elderly women with locally advanced or metastatic breast cancer: novel treatment predictive factors identified. **Cancer Lett.**, v. 313, n. 2, p. 145-153, 27 dez. 2011.

HACKENBERG, S. et al. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 52, n. 7, p. 582-589, ago. 2011.

HADORN, G. H. et al. **Handbook of Transdisciplinary Research**. Suíça: Springer, 2008. 448 p.

HAGENS, W. I. et al. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 49, n. 3, p. 217-229, dez. 2007.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urol. Oncol.**, v. 26, n. 1, p. 57-64, jan-fev. 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 4 mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 7 jan. 2000.

HARPER, S. L. et al. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 4688-4697, 28 jun. 2011.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 3, p. 214-221, mar. 2003.

HARRISON, M.; TOMLINSON, D.; STEWART, S. Liposomal-entrapped doxorubicin: An active agent in AIDS-related Kaposi's sarcoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 13, n. 4, p. 914-920, abr. 1995.

HARTMANN, A. et al. Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, n.8, p. 843-858, ago. 2001a.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 208-212, 2009.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 338-349, 2011.

HASHIMOTO, M.; TONG, R.; KOHANE, D. S. Microdevices for nanomedicine. **Mol. Pharm.**, v. 10, n. 6, p. 2127-2144, 3 jun. 2013.

HAYASHI, Y. et al. Species differences take shape at nanoparticles: protein corona made of the native repertoire assists cellular interaction. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, n. 24, p. 14367-14375, 17 dez. 2013.

HERZ, J.; CHEN, Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 11, p. 850-859, nov. 2006.

HOCK, S. C.; YING, Y. M.; WAH, C. L. A review of the current scientific and regulatory status of nanomedicines and the challenges ahead. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 65, n. 2, p. 177-195, mar-abr. 2011.

HOSHINO, Y. et al. The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 1, p. 33-38, 3 jan. 2012.

HUANG, K. et al. Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. **ACS Nano**, v. 6, n. 5, p. 4483-4493, 22 maio 2012.

HUNT, G. **The Global Ethics of Nanotechnology**. In: HUNT, G.; MEHTA, M. *Nanotechnology: Risk, Ethics and Law*. London: Earthscan, 2006. cap 5.

HUYNH, N. T. et al. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. **Int. J. Pharm.**, v. 379, n. 2, p. 201-209, 11 set. 2009.

IAVICOLI, I. et al. Biomarkers of nanomaterial exposure and effect: current status. **J. Nanopart. Res.**, v. 26, p. 2302, fev. 2014.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer - O que é o câncer? 2014a. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 26 jan 2014.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas 2014. 2014b. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 26 jan 2014.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs**, v. 1-42, s. 7, p. 1-449, 1987.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO Technical Specification on Nanotechnologies – Vocabulary – (Pt 1): Core terms (ISO/TS 80004-1:2010); European Commission draft recommendation on the definition of the term “nanomaterial”. 2010. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=44278>. Acesso em: 5 abr 2013.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TC 229 Nanotechnologies. 2005. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983>. Acesso em: 24 mar 2014.

ISHIDA, T.; KIWADA, H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 354, n. 1-2, p. 56-62, 16 abr. 2008.

ISHIDA, T.; KIWADA, H. Anti-polyethyleneglycol Antibody Response to PEGylated Substances. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36, n. 6, p. 889-891, 2013.

JAGETIA, G. C.; NAYAK, V. Micronuclei-induction and its correlation to cell survival in HeLa cells treated with different doses of adriamycin. *Cancer Lett.*, v. 110, n. 1-2, p. 123-128, 20 dez. 1996.

JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 7, n. 11, p. 653-664, nov. 2010.

JIANG, X. et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. **Toxicol. Lett.**, v. 222, n. 1, p. 55-63, 12 set. 2013.

JOHN, M. B. et al. Hazard Assessment for Nanoparticles: Report from an Interdisciplinary Workshop. **Environ. Health Perspect.**, v. 115, n. 11, p. 1654-1659, nov. 2007.

JOMINI, S. et al. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO₂ nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO₂-based nanocomposite. **Toxicol. Lett.**, v. 215, n. 1, p. 54-61, 23 nov. 2012.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In Vitro Assessments of Nanomaterial Toxicity. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 61, n. 6, p. 438-456, 21 jun. 2009.

JORIS, F. et al. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 21, p. 8339-8359, 7 nov. 2013.

KANTER, P. M. et al. Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal doxorubicin (TLC D-99) versus free doxorubicin in beagle dogs. **In Vivo**, v. 7, n. 1, p. 17-26, jan-fev. 1993.

KANTER, P. M. et al. Preclinical Toxicology Study of Liposome Encapsulated Doxorubicin (TLC D-99): Comparison with Doxorubicin and empty liposomes in mice and dogs. **In Vivo**, v. 7, n. 1, p. 85-95, jan-fev. 1993.

KIM, B. Y.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. Nanomedicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 363, n. 25, p. 2434-2443, 16 dez. 2010.

KIM, H. R. et al. Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. **Environ. Health Toxicol.**, v. 28, p. e2013003, 2013.

KIRKLAND, D. et al. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. **Mutat. Res.**, v. 721, n. 1, p. 27-73, 18 mar. 2011.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v. 17, n. 1, p. 37-43, jan. 2002.

KOCBACH, A. et al. Differential binding of cytokines to environmentally relevant particles: A possible source for misinterpretation of in vitro results? **Toxicol. Lett.**, v. 176, n. 2, p. 131-137, jan. 2008.

KUMAR, G.; DHYANI, A.; KOTHIYAL, P. Nanoparticles: An Overview. **Indian J. Novel Drug Deliv.**, v. 5, n. 3, p. 115-129, 2013.

KREWSKI, D. et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. **J Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.**, v. 13, p. 51–138, 2010.

KROLL, A. et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 8, n. 1, p. 9, 23 fev. 2011.

KROLL, A. et al. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 72, n. 2, p. 370–377, jun. 2009.

KROLL, A. et al. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. **Arch. Toxicol.**, v. 86, n. 7, p. 1123-1136, jul. 2012.

KUHLBUSCH, T. A. et al. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: a review. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 8, p. 22, jul. 2011.

KUTANZI, K. R. et al. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. **Clin. Epigenetics.**, v. 2, n. 2, p. 171-185, ago. 2011.

LAI, J. C. et al. Treatment of human astrocytoma U87 cells with silicon dioxide nanoparticles lowers their survival and alters their expression of mitochondrial and cell signaling proteins. **Int. J. Nanomedicine**, v. 5, p. 715-23, 5 out. 2010.

LAI, Z. W. et al. Emerging techniques in proteomics for probing nano-bio interactions. **ACS Nano**, v. 6, n. 12, p. 10438-10448, 21 dez. 2012.

LANDSIEDEL, R. et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – Many questions, some answers. **Mutat. Res.**, v. 681, n. 2-3, p. 241-258, mar-jun. 2009.

LANKOFF, A. et al. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. **Toxicol. Lett.**, v. 208, n. 3, p. 197–213, 5 fev. 2012.

LANONE, S.; BOCZKOWSKI, J. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms. **Curr. Mol. Med.**, v. 6, n. 6, p. 651-663, set. 2006.

LAURENT, S. et al. Significance of cell "observer" and protein source in nanobiosciences. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 392, n. 1, p. 431-445, 15 fev. 2013.

LAUTERWASSER, C. **Small sizes that matter: Opportunities and risks of Nanotechnologies**. Germany: Allianz AG, 2005. 46 p.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-49, jan. 2008.

LINDBERG, H. K. et al. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. **Toxicol. Lett.**, v. 186, n. 3, p. 166-173, 8 maio 2009.

LINSINGER, T. P. J.; ROEBBEN, G. Reference materials for measuring the size of nanoparticles. **Trends Analyt. Chem.**, v. 30, n. 1, p. 18-27, jan. 2011.

LIU, G. et al. Genome chaos: Survival strategy during crisis. **Cell Cycle**, v. 13, n. 4, p. 528-537, 15 fev. 2014.

LIU, Y.; SOLOMON, M.; ACHILEFU, S. Perspectives and potential applications of nanomedicine in breast and prostate cancer. **Med. Res. Rev.**, v. 33, n. 1, p. 3-32, jan. 2013.

LOVESTAM, G. et al. **Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010. 40 p.

LYNCH, I. et al. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 134-135, n. 1, p. 167-174, 31 out. 2007.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interaction. **Nanotoday**, v. 3, n. 1-2, p. 40-47, fev-abr. 2008.

MA, H.; ZHAO, H. Drug target inference through pathway analysis of genomics data. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 7, p. 966-972, jun. 2013.

MA, X.; ZHAO, Y.; LIANG, X. J. Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceuticals. **Acc. Chem. Res.**, v. 44, n. 10, p. 1114-1122, 18 out. 2011.

MACOUBRIE, J. Informed public perceptions of nanotechnology and trust in government. **Woodrow Wilson International Center for Scholars**. 2005. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/process/files/2709/8_informed_public_perceptiper_of_nano_technology_and_trust_in_government.pdf>. Acesso em: 05 jul 2014.

MADANI, S. Y. et al. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. **Int. J. Nanomedicine**, v. 6, p. 2963-29679, 2011.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. Control. Release**, v. 65, n. 1-2, p. 271-284, 1 mar. 2000.

MAGDOLENOVA, Z. et al. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. **J. Environ. Monit.**, v. 14, n. 2, p. 455-464, fev. 2012a.

MAGDOLENOVA, Z. et al. Mechanisms of genotoxicity: A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, v. 8, n. 3, p. 233-278, maio, 2014. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/17435390.2013.773464>>. Acesso em: 24 mar 2014.

- MAGDOLENOVA, Z. et al. Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v. 75, n. 13-15, p. 800-806, 1 jul. 2012b.
- MAHMOUDI, M. et al. Cell "vision": complementary factor of protein corona in nanotoxicology. **Nanoscale**, v. 4, n. 17, p. 5461-5468, 7 set. 2012.
- MAIORANO, G. et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7481-7491, 28 dez. 2010.
- MARKMAN, J. L. et al. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 13-14, p. 1866-1879, 30 nov. 2013.
- MARTIN-CARBONERO, L. et al. Long-term prognosis of HIV-infected patients with Kaposi sarcoma treated with pegylated liposomal doxorubicin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 3, p. 410-417, 1 ago. 2008.
- MARX, U. et al. 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? **Altern. Lab. Anim.**, v. 40, n. 5, p. 235-257, 2012.
- MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; CULLIS, P. R. Strategies for optimizing liposomal doxorubicin. **J. Liposome Res.** v. 1, n. 4, p. 463-480, 1990.
- MENDELSON, J. Personalizing oncology: perspectives and prospects. **J. Clin. Oncol.**, v. 31, n. 15, p. 1904-1911, 20 maio 2013.
- MEUNIER, E. et al. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. **Nanomedicine**, v. 8, n. 6, p. 987-995, ago. 2012.
- MCTI. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia – CBAN. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/24251.html>>. Acesso em: 24 mar 2014.
- MILANOVIC, V.; BUCALINA, A. Position of the Countries in Nanotechnology and Global Competitiveness. **J. Theory Pract. Manage.**, v. 68, p. 69-79, 2013.
- MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 2, p. 185-229, jun. 2004.
- MISTRY, A. R. et al. DNA Topoisomerase II in Therapy-Related Acute Promyelocytic Leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 1529-1538, 14 abr. 2005.
- MITRA, M. et al. A novel in vitro three-dimensional retinoblastoma model for evaluating chemotherapeutic drugs. **Mol. Vision**, v. 18, p. 1361-1378, 2012.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A. et al. Protein binding modulates the cellular uptake of silver nanoparticles into human cells: implications for in vitro to in vivo extrapolations? **Toxicol. Lett.**, v. 220, n. 3, p. 286-293, 18 jul. 2013.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. **Carbon**, v. 44, n. 6, p. 1070–1078, maio 2006.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O.; ZHANG, L. W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 234, n. 2, p. 222-235, 15 jan. 2009.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciênc. Cult.**, v. 60, p. 30–35, 2008.

MUGGIA, F. M. et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: Antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. **J. Clin. Oncol.**, v. 15, n. 3, p. 987-993, 1997.

MURDAY, J. S. et al. Translational nanomedicine: status assessment and opportunities. **Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 251-273, set. 2009.

NAG, O. K.; AWASTHI, V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. **Pharmaceutics**. v. 5, n. 4, p. 542-569, 25 out. 2013.

NANOMATERIALREGISTRY. Disponível em: <<https://www.nanomaterialregistry.org/Default.aspx>> Acesso em: 24 mar 2014.

NANOTECHNOLOGY NOW. **Hundreds of EPA Scientists Report Political Interference Over Last Five Years**. 24 abr. 2008. Disponível em: <http://www.nanotech-now.com/news.cgi?story_id=29078>. Acesso em: 05 jul 2014.

NATH, J.; KRISHNA, G. Safety screening of drugs in cancer therapy. **Acta Haematol.**, v. 99, n. 3, p. 138-147, 1998.

NNI. NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. NNI Program Component Areas. Estados Unidos das América, 2014. Disponível em: <<http://www.nano.gov/nni-pca>>. Acesso em: 21 mar 2013.

NNI. NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. NSI: Nanotechnology Knowledge Infrastructure: Enabling National Leadership in Sustainable Design. 2012. 11 p. Disponível em: <http://nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nki_nsi_white_paper_-_final_for_web.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

NEGRINI, M. et al. Potential topoisomerase II DNA-binding sites at the breakpoints of a t(9;11) chromosome translocation in acute myeloid leukemia. **Cancer Res.**, v. 53, n. 19, p. 4489-4492, 1 out. 1993.

NEL, A. et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. **Acc. Chem. Res.**, v. 46, n. 3, p. 607-621, 19 mar. 2013.

NEMMAR, A. et al. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 1-22, 2013.

NEW, R.R.C. **Liposomes: A practical approach**, New York: Oxford University, 1990.

NORTHFELT, D. W. et al. Efficacy of pegylated-liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma after failure of standard chemotherapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 15, n. 2, p. 653–659, 1997.

NORTHFELT, D. W. et al. Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized phase III clinical trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 7, p. 2445–2451, 1998.

NÚÑEZ, M. et al. Response to liposomal doxorubicin and clinical outcome of HIV-1-infected patients with Kaposi's sarcoma receiving highly active antiretroviral therapy. **HIV Clin. Trials**, v. 2, n. 5, p. 429-437, set-out. 2001.

OBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J. Intern. Med.**, v. 267, n. 1, p. 89-105, jan. 2010.

OBERDÖRSTER, G., OBERDÖRSTER, E., OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ. Health Perspect.**, v. 113, n. 7, p. 823-839, jul. 2005.

O'BRIEN, M. E. et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Ann. Oncol.**, v. 15, n. 3, p. 440-449, mar. 2004.

OESCH, F.; LANDSIEDEL, R. Genotoxicity investigations on nanomaterials. **Arch. Toxicol.**, v. 86, n. 7, p. 985-994, jul. 2012.

OLOPADE, O. I. et al. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 24, p. 7988-7999, 15 dez. 2008.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Database on Research into the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2009a. Disponível em: <<http://webnet.oecd.org/NANOMATERIALS/Pagelet/Front/Default.aspx>>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test: No. 471, p. 1-11, 1997a. Disponível em: <www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals. Erythrocytes Micronucleus Test: No. 474, p. 1-10, 1997b. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft_TG474_second_commenting_round.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals. In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test: No. 476, p. 1-10, 1997c. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948426.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals. In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test: No. 487, p. 1-10, 1997d. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG487%20Oct%202012%20updated%2029oct.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test: No. 473, p. 1-10, 1997e. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948434.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials** Paris: [s. n.], 2009b.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**. 2014. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788>. Acesso em: 5 jul 2014.

ONG, K. J. et al. Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90650, mar. 2014.

ORLOWSKI, R. Z. et al. Randomized Phase III Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin Plus Bortezomib Compared With Bortezomib Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Combination Therapy Improves Time to Progression. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 25, p. 3892-3901, 1 set. 2007.

PANNEERSELVAM, S.; CHOI, S. Nanoinformatics: Emerging Databases and Available Tools. **Int J Mol Sci.**, v. 15, n. 5, p. 7158-7182, 2014.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, fev. 2012.

PEREZ, E. A. Evolving Paradigms for Optimizing Management of Metastatic Breast Cancer. In: ONCOLOGY ANNUAL MEETING, 2011, Chicago. **New Frontiers and Treatment Paradigms for Metastatic Breast Cancer**. Clin. Adv. Hematol. Onco., v. 9, n. 8, s. 20, ago. 2011. Disponível em: <http://www.hematologyandoncology.net/files/2013/04/ho0811_sup201.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

PFALLER, T. et al. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 1, p. 52-72, mar. 2010.

PHARMAPENDIUM. **Doxorubicin Hydrochloride.** Disponível em: <<https://pharmapendium.com/drugs/drug.do?name=Doxorubicin+Hydrochloride>>. Acesso em: 05 jul 2014.

PHARMAPENDIUM. **Doxorubicin Liposomal.** Disponível em: <<https://pharmapendium.com/drugs/drug.do?name=Doxorubicin%2C+Liposomal>>. Acesso em: 05 jul 2014.

PIVER, M. S. et al. Doxorubicin hydrochloride (adriamycin) cardiotoxicity evaluated by sequential radionuclide angiography. **Cancer**, v. 56, n. 1, p. 76-80, 1 jul. 1985

PORTNEY, N. G.; OZKAN, M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 384, n. 3, p. 620-630, fev. 2006.

POWERS, K. et al. Characterization of the size, shape and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2007.

PUISIEUX, F. et al. **Liposomes, new systems and new trends in their applications.** Paris: de Santé, 1995. 266 p.

PULSKAMP, K.; DIABATÉ, S.; KRUG, H. F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicol. Lett.**, v. 168, n. 1, p. 58-74, 10 jan. 2007.

PURVES, D. et al. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, v. 10, n. 4, p. 297-312, jul. 1995.

RANSON, M. R. et al. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: Results of a multicenter phase II trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 15, n. 10, p. 3185-3191, out. 1997.

RASHEED, Z. A.; RUBIN, E. H. **Topoisomerase-interacting agents.** In: DEVITA, V. T. Jr.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology.** 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

RAYSON, D. et al. Cardiac safety of adjuvant pegylated liposomal doxorubicin with concurrent trastuzumab: a randomized phase II trial. **Ann. Oncol.**, v. 23, n. 7, p. 1780-1788, jul. 2012

RENANOSOMA. Quem somos. 2014. Disponível em: <<http://nanotecnologiadoavesso.org/quem-somos>>. Acesso em: 22 abr 2013.

RIVERA-GIL, P. et al. The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. **Acc. Chem. Res.**, v. 46, n. 3, p. 743-749, 19 mar. 2013.

RIVIERE, J. E. et al. Computational approaches and metrics required for formulating biologically realistic nanomaterial pharmacokinetic models. **Comput. Sci. Disc.**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 3 out. 2013.

RUSHTON, E. K. et al. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dose-metric and chemical/biological response metrics. **J. Toxicol. Environ. Health A.** v. 73, n. 5, p. 445-461, 2010.

SANDHIYA, S.; DKHAR, S. A.; SURENDIRAN, A. Emerging trends of nanomedicine--an overview. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 23, n. 3, p. 263-269, jun. 2009.

SÃO PAULO (Estado). Instrução Normativa n. 2 de 15 de junho de 2012. Baixa o Regulamento Técnico para integração dos Laboratórios Estratégicos e dos Laboratórios Associados ao Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia - SisNANO e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, São Paulo, SP, 27 jun. 2012a. Seção 1, p. 4. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2012/iels.jun.12/Iels120/U_IN-MCTI-GM-2_150612.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

SÃO PAULO (Estado). Portaria n. 245 de 5 de Abril de 2012. Institui o Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias - SisNANO como um dos elementos do Programa Nacional de Nanotecnologia, no âmbito da Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação e associado ao Plano Brasil Maior. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, São Paulo, SP, 9 abr. 2012b. Seção 1, p. 5. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2012/iels.abr.12/Iels67/U_PT-MCTI-GM-245_050412.pdf>. Acesso em: 24 mar 2014.

SARGENT, J. F. JR. The National Nanotechnology Initiative: Overview, Reauthorization, and Appropriations Issues. CRS Report for Congress, p. 1-69, 17 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.fas.org/sfp/crs/misc/RL34401.pdf>>. Acesso em: 24 mar 2014.

SARGENT, J. F. JR. Nanotechnology and U.S. Competitiveness: Issues and Options. CRS Report for Congress, p. 1-30, 15 maio 2008. Disponível em: <<http://fas.org/sfp/crs/misc/RL34493.pdf>>. Acesso em: 05 jul 2014.

SAYES, C. M.; WARHEIT, D. B. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 1, n. 6, p. 660-670, nov-dez. 2009.

SCHMIDT, C. W. TOX 21: New Dimensions of Toxicity Testing. **Environ. Health Perspect.**, v. 117, p. A348-A353, 2009.

SENCHENKOV, A.; LITVAK, D. A.; CABOT, M. C. Targeting ceramide metabolism - a strategy for overcoming drug resistance. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, n. 5, p. 347-357, 7 mar. 2001.

SEOANE, J.; DE MATTOS-ARRUDA, L. The challenge of intratumour heterogeneity in precision medicine. **J. Intern. Med.**, 24 mar. 2014. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12240/abstract>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

SEYNHAEVE, A. L. et al. Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging. **J. Control Release**, v. 172, n. 1, p. 330-340, 28 nov. 2013

SHARMA, M. R.; MAITLAND, M. L.; RATAIN, M. J. Models of excellence: improving oncology drug development. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 92, n. 5, p. 548-550, nov. 2012.

SHEN, H. et al. Enhancing chemotherapy response with sustained EphA2 silencing using multistage vector delivery. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 7, p. 1806-1815, 1 abr. 2013.

SHI, J. et al. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. **Acc. Chem. Res.**, v. 44, n. 10, p. 1123-1134, 18 out. 2011.

SHIMIZU, T. et al. Intravenous Administration of Polyethylene Glycol-Coated (PEGylated) Proteins and PEGylated Adenovirus Elicits an Anti-PEG Immunoglobulin M Response. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 8, p. 1336-1342, 2012.

SHINOHARA, N.; GAMO, M.; NAKANISHI, J. Fullerene c60: inhalation hazard assessment and derivation of a period-limited acceptable exposure level. **Toxicol. Sci.**, v. 123, n. 2, p. 576-589, out. 2011.

SHUKLA, S. et al. Porous gold nanospheres by controlled transmetalation reaction: a novel material for application in cell imaging. **Chem. Mater.**, v. 17, n. 20, p. 5000-5005, 2005.

SIMPSON, J. K.; MILLER, R. F.; SPITTLE, M. F. Liposomal doxorubicin for treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)**, v. 5, n. 6, p. 372-374, 1993.

SINGH, N. et al. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23-24, p. 3891-3914, ago. 2009.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutat. Res.**, v. 488, n. 2, p. 151-169, maio 2001.

SOCIETY, T. R. **Nanomanufacturing and the industrial application of nanotechnologies**. In: Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London: Clyvedon, 2004. cap 4.

SONG, M. M. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of iron nanowires. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1509-1517, mar. 2010.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay: A sensitive Genotoxicity Test for the detection of ADN damage and Repair. **Methods Mol. Biol.**, v. 314, p. 275-286, 2006.

STEPHENS, M. L. et al. Evidence-based toxicology for the 21st century: opportunities and challenges. **ALTEX**, v. 30, n. 1, p. 74-103, 2013.

STERN, S. T. et al. Prediction of nanoparticle prodrug metabolism by pharmacokinetic modeling of biliary excretion. **J. Control. Release.**, v. 172, n. 2, p. 558-567, dez. 2013.

STEWART, S. et al. Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS related Kaposi's sarcoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 2, p. 683-691, fev. 1998.

STRATMEYER, M. E. et al. What we know and don't know about the bioeffects of nanoparticles: developing experimental approaches for safety assessment. **Biomed. Microdevices**, v. 12, n. 4, p. 569-573, ago. 2010.

SVENSON, S. What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 6, n. 2, p. 125-135, mar-abr. 2014.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs and radiocontrast agents. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 18, p. 567-606, 2001.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. **Toxicology**, v. 216, n. 2-3, p. 106-121, 2005.

SZEBENI, J. The interaction of liposomes with the complement system. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 15, p. 57-88, 1998.

TANIGUCHI, N. **On the Basic Concept of 'NanoTechnology'**. In: Proceedings of the International Conference on Production Engineering. Tokyo: JSPE. v. 2, p. 18-23, 1974.

TARDI, P.; BOMAN, N.; CULLIS, P. Liposomal Doxorubicin. **J. Drug Target**. v. 4, n. 3, p. 129-140, 1996.

TENZER, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nat. Nanotechnol.**, v. 8, n. 10, p. 772-781, out. 2013.

THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. Strategic Plan. Washington: Office of Science and Technology Policy, 2007. 46 p. Disponível em: <http://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nni_strategic_plan_2007.pdf?q=NNI_Strategic_Plan_2007.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, 15 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X14000350>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

THYBAUD, V. et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. **Mutat. Res.**, v. 627, n. 1, p. 41-58, 3 fev. 2007.

UNGER, R. E. et al. Human endothelial and osteoblast co-cultures on 3D biomaterials. **Methods Mol. Biol.**, v. 695, p. 229-241, 2011.

UE. UNIÃO EUROPEIA. Regulamento Delegado (UE) N.º 1363/2013 da Comissão - de 12 de dezembro de 2013. **JO**, n. 343, p. 26-28, 2013.

UFRJ. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Nanociência e Nanotecnologia - Sobre o curso**. 2014. Disponível em: <<http://www.nano.ufrj.br/graduacao.html>>. Acesso em: 26 jan 2013.

VAIL, D. M. et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies. **Semin. Oncol.**, v. 31, n. 6, s. 13, p. 16-35, dez. 2004.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, dez. 2002.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet Assay: A method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **Bioimpacts**, v. 1, n. 2, p. 87-97, 2011.

VENDITTO, V. J.; SZOKA JR, F. C. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs! **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 80-88, jan. 2013.

VINOGRADOV, S.; WEI, X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. **Nanomedicine (Lond)**, v. 7, n. 4, p. 597-615, abr. 2012.

WANG, H.; LI, F.; DU, C.; WANG, H.; MAHATO, R. I.; HUANG, Y. Doxorubicin and Lapatinib Combination Nanomedicine for Treating Resistant Breast Cancer. *Mol. Pharm.*, Jan 17 2014. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp400687w>>. Acesso em: 14 abr 2014.

WANG, J.; FANG, X.; LIANG, W. Pegylated Phospholipid Micelles Induce Endoplasmic Reticulum-Dependent Apoptosis of Cancer Cells But Not Normal Cells. **ACS Nano.**, v. 6, n. 6, p. 5018-5030, 26 jun. 2012.

WANG, K. et al. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. **Int. J. Nanomedicine**, v. 8, p. 899-908, 2013.

WANG, M. et al. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 710-729, dez. 2011.

WANG, R.; BILLONE, P. S.; MULLETT, W. M. Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. **J. Nanomater.**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

WARHEIT, D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? **Toxicol. Sci.**, v. 101, n. 2, p. 183-185, fev. 2008.

WARHEIT, D. B.; DONNER, E. M. Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. **Nanotoxicology**, v. 4, p. 409-413, dez. 2010.

WATSON, C. et al. High-Throughput Screening Platform for Engineered Nanoparticle-Mediated Genotoxicity Using CometChip Technology. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2118-2133, 2014.

WEI, A.; MEHTALA, J. G.; PATRI, A. K. J. Challenges and Opportunities in the Advancement of Nanomedicines. **J. Control. Release**, v. 164, n. 2, p. 236-246, 10 dez. 2012.

WEI, C. et al. From bench to bedside: successful translational nanomedicine: highlights of the Third Annual Meeting of the American Academy of Nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 322-331, dez. 2007.

WEISS, R. B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Semin. Oncol.**, v. 19, n. 6, p. 670-686, dez. 1992.

WHITESIDES, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 10, p. 1161-1165, out. 2003.

WICK, P. et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. **Environ. Health Perspect.**, v. 118, n. 3, p. 432-436, mar. 2010.

WINER, E. P. et al. Malignant tumors of the breast. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1651-1717, 2001.

WISE, K.; BRASUEL, M. The current state of engineered nanomaterials in consumer goods and waste streams: the need to develop nanoproperty-quantifiable sensors for monitoring engineered nanomaterials. **Nanotechnol Sci. Appl.**, v. 4, p. 73-86, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Media Centre - Cancer - Fact sheet. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 26 jan 2014.

WÖRLE-KNIRSCH, J. M.; PULSKAMP, K.; KRUG, H. F. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. **Nano Lett.**, v. 6, n. 6, p. 1261-1268, jun. 2006.

XU, Z. et al. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. **Int. J. Pharm.** v. 228, n. 2, p. 361-368, jan. 2005.

YAN, D. et al. Cellular compatibility of biom mineralized ZnO nanoparticles based on prokaryotic and eukaryotic systems. **Langmuir**, v. 27, n. 21, p. 13206-13211, 21 nov. 2011.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, jan. 2014.

YU, K. D. et al. Genetic variants in oxidative stress-related genes predict chemoresistance in primary breast cancer: a prospective observational study and validation. **Cancer Res.**, v. 72, n. 2, p. 408-419, 15 jan. 2012.

ZAFFARONI, A. Biotechnology - Way Cool Drug Delivery: Alza. 1968. Disponível em: <<http://www.biology.iupui.edu/biocourses/Biol540/4pipelineAlza.htm>>. Acesso em: 26 jan 2013.

ZHANG, P. et al. Novel nanostructured lipid-dextran sulfate hybrid carriers overcome tumor multidrug resistance of mitoxantrone hydrochloride. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 185-193, fev. 2012.

ZHOU, Y.; KOPEČEK, J. Biological rationale for the design of polymeric anti-cancer nanomedicines. **J Drug Target**. v. 21, n. 1, p. 1-26, jan. 2013.