

## ARTIGO

# Desafios atuais da pesquisa em toxicologia: Avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados para o desenvolvimento

**Isabella Fernandes  
Delgado**

*Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em  
Saúde, Fundação Oswaldo  
Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio  
de Janeiro, RJ, Brasil*  
E-mail: [isabella.delgado@  
incqs.fiocruz.br](mailto:isabella.delgado@incqs.fiocruz.br)

**Francisco J.R.  
Paumgarten**

*Escola Nacional de Saúde  
Pública Sergio Arouca,  
Fundação Oswaldo Cruz  
(ENSP/Fiocruz), Rio de  
Janeiro, RJ, Brasil*

## RESUMO

Nanomateriais são partículas ou fibras que possuem pelo menos uma das três dimensões na faixa de tamanho entre 1 e 100 nm. Em virtude das suas propriedades físico-químicas ímpares as nano partículas têm uma variedade de usos na indústria e cada vez mais fazem parte do nosso cotidiano. Entretanto, apesar do número crescente de produtos da nanotecnologia chegando ao mercado, a avaliação dos riscos das NPs para saúde está na sua infância. Os efeitos nocivos das NPs sobre o desenvolvimento pré-natal tem sido ainda menos investigados. Este artigo sumariza a literatura sobre os efeitos das NPs sobre o desenvolvimento. Os estudos são em geral muito recentes e incluem experimentos *ex vivo* empregando invertebrados e vertebrados não-mamíferos, ensaios *in vitro* (células tronco embrionárias de camundongos) e *in vivo* em roedores. Muito pouco tem sido publicado a respeito dos efeitos das NPs na placenta e sobre a passagem das NPs da mãe para o embrião e feto humanos. Algumas limitações dos ensaios *ex vivo* e *in vitro* para evidenciar potenciais perigos das NPs para o desenvolvimento prenatal humano são discutidas nesta revisão. As diferenças de estrutura e função entre a placenta de roedores e a placenta humana no período inicial da gravidez e a possível relevância delas para a transferencia transplacentária de NPs também são comentadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanoparticulas; Nanotoxicologia; Placenta; Avaliação de Risco; Toxicidade Reprodutiva



## Abreviações

NPs, Nano-sized particles; NNI, US National Nanotechnology Initiative; MCTI, Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation; AUC, area under the curve;  $C_{max}$ , peak plasma, serum or blood concentration; PND, postnatal day; GD, gestational day; QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships; EPR, Enhanced Permeability and Retention; EGFR, epidermal growth factor receptor; EST, mouse embryonic stem cell test; FETAX, Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*; MTT assay, MTT dye (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) cytotoxicity assay; SWCNT, single wall carbon nanotubes; MWCNT, multiwall carbon nanotubes; SCID, severe combined immunodeficiency mouse strain (lacking in T and B lymphocytes and immunoglobulins).

## Introdução

Nano(n), do grego “nannos” (“anão”), se refere a  $10^{-9}$  de uma unidade de medida (por exemplo, 1 metro =  $10^9$  nanômetros, 1 litro =  $10^9$  nanolitros, 1 grama =  $10^9$  nanogramas). É um dos 20 prefixos latinos ou gregos que denotam múltiplos decimais ( $10^n$ ) ou submúltiplos ( $10^{-n}$ ) das unidades no Sistema Internacional de Unidades (SI). Nas últimas décadas o prefixo nano também tem sido utilizado para definir novos campos de estudo, tais como as nanociências (o estudo das propriedades de estruturas, dispositivos e materiais ultra pequenos, normalmente com dimensões que variam entre 0,1 e 100 nm) e a nanotecnologia, que é o desenho, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através do controle de sua forma e tamanho a uma escala nanométrica.

O surgimento da nanotecnologia parece ter sido inspirado em uma palestra intitulada “There’s plenty of room at the bottom” ministrada por Richard Phillips Feynman no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech, Pasadena, CA) em 29 de dezembro de 1959. Feynman, um proeminente físico teórico americano e Prêmio Nobel, conhecido por suas contribuições para a mecânica quântica, esboçou um mundo de novas tecnologias que seriam capazes de operar e construir máquinas na menor escala possível, “estruturando objetos átomo por átomo” e chegando ao auge da miniaturização. Ele também observou que nesta escala reduzida a magnitude de diversos fenômenos físicos poderia mudar – a gravidade poderia se tornar menos importante ao passo que a tensão superficial e as forças de Van der Waals se tornariam mais relevantes. No entanto, o termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez pelo cientista japonês Norio Taniguchi em uma conferência realizada em 1974. Falando sobre semicondutores, Taniguchi definiu nanotecnologia como sendo “o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula”. A ideia da nanotecnologia foi desenvolvida e popularizada por Eric Drexler Kim através de vários artigos e um livro (“Veículos de criação: a chegada da era da nanotecnologia”), publicado em 1986<sup>1,2,3,4</sup>.

Em 2000 o governo dos EUA criou o programa *National Nanotechnology Initiative* (NNI), um esforço interinstitucional de apoio

à investigação em nanotecnologia e desenvolvimento em laboratórios acadêmicos, governamentais e industriais em todo o país<sup>5</sup>. Na mesma linha, em 2003 o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) criou um grupo de trabalho de especialistas para fazer recomendações de um programa de governo de apoio ao desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia no Brasil. A NNI definiu a nanotecnologia como “a compreensão e controle da matéria de dimensões entre cerca de 1 e 100 nm, onde fenômenos únicos permitem o desenvolvimento de novas aplicações”, enquanto que o grupo de trabalho brasileiro a descreveu como “um conjunto de ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação que podem surgir a partir de propriedades especiais da matéria organizada em estruturas, cujas dimensões estão na escala nanométrica”<sup>6,7</sup>.

Em sua palestra, Feynman ressaltou que quando as dimensões de um material são extremamente reduzidas, aproximando-se do nível atômico ou molecular (escala nanométrica), algumas de suas propriedades físicas podem mudar drasticamente. À medida que as dimensões de um material diminuem, inicialmente as propriedades físicas permanecem inalteradas, seguida de pequenas alterações, e quando o tamanho cai abaixo de um certo nível (por exemplo, <100 nm)<sup>8</sup>, mudanças drásticas poderão ocorrer. Algumas alterações relacionadas ao tamanho, tais como o aumento na razão área superficial/volume (ou área superficial por unidade de massa) são alterações graduais, que se tornam cada vez mais importantes à medida que o tamanho da partícula se reduz. Contudo, outras alterações nas propriedades físicas e químicas ocorrem em pontos críticos, quando a redução no tamanho das partículas se aproxima da escala nanométrica. Estes chamados efeitos quânticos podem envolver alterações nas propriedades elementares, tais como ponto de fusão e cor, alterações no comportamento aerodinâmico e aumento na percentagem de átomos e moléculas que se encontram na superfície da partícula. Todas essas alterações físicas e químicas podem afetar as interações das partículas com sistemas biológicos e portanto podemos supor que os efeitos na saúde e a toxicidade dos materiais também podem ser drasticamente afetados na escala nanométrica.

Quanto à regulamentação dos riscos, os produtos nanotecnológicos geralmente são definidos pelo seu tamanho e não pela sua composição química. No entanto, tem havido controvérsias

i The definition recommended by the European Commission states that “Nanomaterial means a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm-100 nm”. (2011/696/EU; Official Journal L, 275(2011) pp. 38-40). Although some consensus has been reached on the size range of nanomaterials (1-100 nm) (ISO 2012; <http://www.iso.org/obp/ui/#home>), in fact there is no clear size threshold or point for changes in physicochemical properties, thus the chosen 100nm cut off was an arbitrary and political choice rather than a science-based decision.

ii Occupational exposure to manufactured or engineered nanomaterials was originally regulated as “particulates not otherwise regulated” (PNOR) by US OSHA (2006)<sup>9</sup>.



a respeito da definição dos termos “nanopartículas” e “nanoparticulado” e sobre quantas dimensões devem ser inferiores a 100 nm para atender tais definições<sup>8,ii</sup>. Caso pelo menos uma dimensão (de uma estrutura tridimensional) esteja na escala de 1 a 100 nm, a partícula é denominada “poço quântico”. Se duas dimensões estiverem na escala nanométrica a estrutura é chamada de “fio quântico”, e se as três dimensões forem nanométricas a estrutura é denominada “ponto quântico”.

## Nanomedicina e nanotoxicologia

Nanomedicina é um termo novo que designa um campo promissor que surgiu a partir da união bem sucedida da nanotecnologia e da medicina<sup>10,11</sup>. A potencial aplicação e incorporação da nanotecnologia na prática clínica envolve principalmente o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o tratamento (por exemplo, sistemas de transporte de medicamentos baseado em nanopartículas (NPs), próteses para implantes projetadas com nanoengenharia), diagnóstico, terapia e monitoramento de condições mórbidas (por exemplo, biomarcadores, biossensores e agentes de contraste para procedimentos de diagnóstico por imagem)<sup>12,13,14</sup>.

Uma vantagem da nanotecnologia no desenvolvimento de medicamentos é a possibilidade de superar a baixa solubilidade aquosa e a baixa biodisponibilidade de princípios ativos<sup>15</sup>. A redução no tamanho das partículas resulta no aumento da taxa de dissolução de formulações sólidas (tais como comprimidos e cápsulas) e melhora a taxa e o tempo de absorção do ingrediente ativo (isto é, a sua biodisponibilidade por via oral) a um nível que é inatingível com medicamentos micronizados<sup>16</sup>. A princípio também é possível desenvolver NPs que transportem ingredientes farmacêuticos ativos a um tecido ou célula alvo (por exemplo, tumores)<sup>iii</sup>. Sistemas de transporte de medicamentos baseados na nanotecnologia são uma abordagem terapêutica promissora, em particular na área da oncologia. Os medicamentos anticancerígenos são tipicamente administrados por infusão intravenosa e muitos dos seus ingredientes ativos são pouco solúveis. Entre os principais problemas das drogas oncológicas que podem ser solucionados pela nanotecnologia estão: a penetração de membranas celulares capazes de inibir a chegada de moléculas ao local alvo, a superação do fenômeno de resistência a múltiplas drogas e a melhoria da estabilidade do ingrediente ativo *in vivo*. Um estudo realizado por Rios-Doria et al.<sup>17</sup> descreveu recentemente um copolímero tribloco capaz de encapsular daunorrubicina e outras drogas anticâncer hidrofílicas<sup>iv</sup> para injeção intravenosa e que melhora a estabilidade de fármacos *in vivo*, bem como a  $C_{max}$  e AUC (*Area Under the Curve*)<sup>17</sup>. O estudo de Rios-Doria et al.<sup>17</sup> é um bom exemplo da contribuição da nanomedicina para a melhoria da eficácia dos agentes hi-

drofóbicos para a quimioterapia do câncer, disponíveis atualmente. Uma inovação com ainda mais impacto é a criação de formulações de medicamentos anticancerígenos que podem atuar especificamente nas células tumorais, evitando danos aos tecidos não tumorais e efeitos adversos<sup>18,19</sup>. Uma das diferenças entre tecidos malignos e não-malignos que parece viabilizar o sistema de transporte de medicamentos anticâncer alvo-seletivos é o fenômeno da permeabilidade aumentada e retenção (*Enhanced Permeability and Retention - EPR*)<sup>v</sup>, que ocorre em tumores sólidos. Devido a drenagem linfática deficiente e angiogênese desregulada, a vasculatura permeável e desestruturada dos tumores sólidos permite que as NPs se acumulem passivamente dentro do tecido maligno. Sengupta et al.<sup>19</sup> usaram como modelo a cisplatina e desenvolveram NPs de platina (II) acoplada ao colesterol que exibiram eficácia antitumoral *in vivo* e *in vitro*<sup>vi</sup> significativamente melhor e com diminuição da toxicidade sistêmica e renal. A viabilidade desta abordagem inovadora também foi observada em estudos que mostraram que as NPs de ouro podem ser usadas para desenvolver drogas anticâncer mais seletivas e menos tóxicas<sup>23,24</sup>. Neste sentido, foi mostrado que o TNF- $\alpha$  conjugado com NPs de ouro se acumula seletivamente em tecidos tumorais e assim permite o fornecimento de doses elevadas desta citocina pró-inflamatória diretamente ao local alvo, contornando os efeitos colaterais indesejáveis causados por níveis elevados de TNF- $\alpha$  na circulação sistêmica<sup>24</sup>.

## Nanotoxicologia ou avaliação dos riscos no uso de nanopartículas

O prefixo “nano” foi adicionado pela primeira vez à toxicologia no início deste século, para definir uma nova subcategoria desta disciplina científica (nanotoxicologia) alguns anos após a nanotecnologia ter se tornado o centro das atenções<sup>25,26,27,28,29</sup>. No entanto, a toxicidade das partículas ultrafinas naturais ou acidentais, incluindo aquelas na faixa de escala nano, não é um tema inteiramente novo para toxicologistas, especialmente para aqueles preocupados com os efeitos da poluição atmosférica na saúde. Há muito tempo sabe-se que os efeitos biológicos de aerossóis e partículas inalados dependem das suas dimensões e conformações, de modo que apenas aqueles menores que 10  $\mu$ m eventualmente atingem os pulmões. Embora contribuam muito pouco para a massa total de partículas poluidoras do ar, as partículas ultrafinas (< 0,01  $\mu$ m de diâmetro) são encontradas em concentrações elevadas no ar poluído, e vários autores acreditam que elas desempenham um papel causal nos efeitos prejudiciais da poluição atmosférica na saúde<sup>30,31,32,33</sup>. Estudos publicados nos anos 90 sugeriram que partículas com diâmetro menor que 100 nm causaram uma

iii A drug delivered directly at a therapeutic target is reminiscent of Paul Ehrlich's concept of a “Magic Bullet” (“magische Kugel”) or the ideal therapeutic agent that would selectively hit the pathogen causing no undesirable effects or injury to patient's organs and tissues.

iv In Rios-Doria et al's study<sup>17</sup>, particle sizes of encapsulated anticancer drugs were 30-80 nm.

v The general mechanism underlying the tumortropic properties of some anticancer proteins was originally reported by Matsumara and Maeda<sup>18</sup> who also introduced the idea of EPR in 1986. Further studies described that the endothelial layer of tumor blood vessels is poorly structured and has larger intercellular gaps (0.5-2.5  $\mu$ m wide)<sup>20,21,22</sup>.

vi Anti-tumor activity was tested *in vivo* in murine 4T1 breast cancer and ovarian cancer models<sup>19</sup>.



**Tabela 1.** Número de artigos que tratam de nanotecnologia, nanotoxicologia e toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento de nanopartículas encontrados na base de dados Pubmed, em 2013, usando diferentes combinações de termos de busca.

Termos de busca	nº de artigos	Publicado pela primeira vez (ano)	nº de artigos em 2012	nº de artigos em 2013*
Nanotecnologia	41.908	1991+	5.920	3.025
Nanopartícula + toxicidade	6.791	1982++	1.528	1.013
Nanotoxicologia	635	2004	237	191
Nanopartícula + gravidez	129	1992	11	18
Nanopartícula + placenta	67	1999	17	13
Nanopartícula + toxicidade do desenvolvimento	91	2006	23	26
Nanotoxicologia + gravidez	9	2009	4	4
Nanotoxicologia + placenta	5	2011	1	3

\* Desde 1º de setembro de 2013. + Um trabalho notável realizado por Kim Drexler (Nanotecnologia: o passado e o futuro) foi publicado em 1992.

++ Um estudo de 1982 realizado por Kante e cols.<sup>37</sup> com NPs depolialquilcianoacrilato foi o artigo mais antigo encontrado no banco de dados Pubmed.

toxicidade (resposta inflamatória) maior no tecido pulmonar quando comparadas com partículas maiores<sup>34,35</sup>.

### Toxicologia do desenvolvimento de materiais nanoestruturados

Em 2011 o relatório de um workshop<sup>vii</sup> internacional sobre a avaliação da segurança dos produtos nanotecnológicos observou que “não estamos nem começando a compreender os potenciais efeitos sobre a saúde, nem temos todas as respostas que o público, autoridades reguladoras e decisores políticos necessitam”<sup>36</sup>. De acordo com a opinião dos participantes do workshop, talvez a nanotoxicologia ainda esteja longe de definir uma estratégia preditiva de ensaios<sup>36</sup>. No que diz respeito aos riscos reprodutivos e de desenvolvimento (ou seja, nanotoxicologia do desenvolvimento), ainda estamos tomando os primeiros passos nesse sentido.

De fato, uma pesquisa na base de dados Pubmed (01 de setembro de 2013) revelou que nanotoxicologia do desenvolvimento não só surgiu muito mais tarde do que o campo mãe da nanotecnologia mas também suscitou menos interesse de pesquisa do que o estudo da toxicidade dos nanomateriais em indivíduos adultos (Tabela 1)<sup>37</sup>.

Ema *et al.*<sup>38</sup>, Campagnolo *et al.*<sup>39</sup> e Sun *et al.*<sup>40</sup> em 2010, 2012 e 2013, respectivamente, revisaram a literatura sobre a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento de nanomateriais manufaturados, enquanto Juch *et al.* em 2013 abordaram a interferência de NPs na função placentária humana<sup>41</sup>.

As revisões anteriores e a pesquisa bibliográfica no Pubmed (Tabela 1) mostraram consistentemente que há relativamente poucos estudos sobre a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento de NPs e que pouco se sabe sobre os efeitos das NPs na placenta durante o início da gravidez.

Como mostrado na Tabela 2, a toxicidade para o desenvolvimento de vários nanomateriais foi avaliada em invertebrados (moluscos e ouriços do mar) e vertebrados não mamíferos (peixes e rãs)<sup>42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55</sup>. O desenvolvimento embrionário do peixe-paulistinha *Danio rerio* é o modelo não-mamífero mais comumente utilizado em estudos de toxicidade reprodutiva das NPs.

As vantagens de usar o peixe-paulistinha como modelo são: a sua fecundidade, pois depositam de 200-300 ovos a cada 5-7 dias; o rápido desenvolvimento embrionário; o fato do desenvolvimento embrionário ocorrer *in vitro* (por exemplo, em placas de poços múltiplos). Considerando que os embriões de peixes-paulistinha permanecem transparentes ao longo da maior parte do desenvolvimento antes da eclosão, a morfogênese dos principais órgãos e estruturas do corpo, tais como cérebro, coluna vertebral, coração, mandíbula, segmentação do corpo, pode também ser observada em tempo real<sup>56</sup>. Ovas de peixe maduras e embriões em desenvolvimento são envoltos por uma camada acelular, o córion. A capacidade do córion de servir como uma barreira protetora eficaz que evita a penetração de diversos compostos não foi avaliada de forma abrangente, de modo que o córion geralmente é removido<sup>viii</sup> para evitar supostos falsos negativos em ensaios preditivos de embriotoxicidade<sup>57,58</sup>. Em princípio, as NPs (< 100 µm em uma dimensão) podem penetrar no embrião do peixe-paulistinha através dos canais dos poros do córion (com diâmetro de 0,5 a 0,7 µm). De fato, foi demonstrado que as Ag NPs penetram no espaço coriônico por difusão passiva e movimento Browniano<sup>42</sup>. No entanto, vários relatos sugerem que o córion atua como uma barreira contra a penetração de SWCNP aglomerados<sup>54</sup> e algumas NPs como TiO<sub>2</sub><sup>53</sup> e SiO<sub>2</sub> e NPs fluorescentes que aderem à superfície do córion mas não entram no embrião<sup>51</sup>.

A toxicidade do desenvolvimento de uma variedade de NPs fabricadas, incluindo as derivadas de metais (Ag, Au, Co, Cu, Ti, Zn), sílica e carbono (SWCNTs, MWCNTs, fulereno ou C60<sup>ix</sup>)

vii The “t<sup>4</sup>-transatlantic think tank for toxicology” workshop<sup>36</sup>, held in 2010, at the 10<sup>th</sup> anniversary of the US NNI, discussed strategies to assess the safety of nanotechnology products. The t<sup>4</sup> workshop was organized by the Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), a center committed to the Three Rs (replacement, reduction and refinement of animal use).

viii Under laboratory test conditions, zebrafish embryos develop normally outside their chorions. The dechorination can be achieved mechanically by using forceps and an enzymatic pretreatment (pronase) that makes the chorion easier to remove.

ix Fullerenes are composed entirely of carbon (e.g., 60 carbons) and may have different forms and shapes such as a hollow sphere, ellipsoid or tube. Carbon nanotubes are cylindrical fullerenes that are usually only a few nanometers wide and range from a micrometer to several millimeters in length.



Tabela 2. Estudos sobre a toxicidade de nanopartículas para o desenvolvimento de espécies não-mamíferos.

Tipo	Nanopartícula (NP)		Espécies	Exposição		Resultados do estudo	Referências
	Tamanho	Estágio de desenvolvimento		Concentração (dose)	Concentração (dose)		
Ag	11.6 (5-46) nm	Danio rerio (peixe)	cleavage stage (8-cell) (chronic exposure)	0-0.71 nM	Ag NP presentes em embriões em diferentes fases; difusão passiva através de poros do córion; indução de alterações concentração-dependentes no embrião: anormalidades na membrana embrionária; flexão e redução da cauda e da medula espinhal; malformação cardíaca; edema no saco vitelino; edema cefálico; alterações oculares	Lee et al 2007 <sup>42</sup>	
SWCNTs	-	Danio rerio (peixe)	96 hpf	120,240,360 mg/L	formação de barreira protetora no córion contra aglomerados SWCNT (escala micro ou maior); toxicidade devido a contaminantes metálicos	Cheng et al 2007 <sup>54</sup>	
Ag	5-46 nm	Danio rerio (peixe)	0.75/2.25 - 120 hpf	0.04 up to 0.71 nM	Transporte aos embriões através de poros do córion; anormalidades embrionárias concentração-dependentes	Lee et al 2007 <sup>55</sup>	
Fullerene (C60)	10-100 nm (tolueno)	Crossostrea virginica (ostra)	2 hpf (48h)	1-1000 ppb	Efeitos adversos no desenvolvimento embrionário e desestabilização de lisossomos; embriões não mais sensíveis do que os adultos	Ringwood et al 2009 <sup>50</sup>	
α-alumina	20-50 nm	Physa acuta (caramujo)	adult snails and egg masses	0.005,0.5,5 g/kg (Sedimento enriquecido)	Crescimento embrionário mais lento; eclosão prejudicada; alterações no desenvolvimento	Musee et al 2010 <sup>48</sup>	
γ-alumina	80-400 nm						
M-TiO <sub>2</sub>	7-11 nm						
C-TiO <sub>2</sub>	40-60 nm						
SiO <sub>2</sub> (estrutura core-shell fluorescente)	≅ 200 nm ≅ 60 nm	Xenopus laevis	96 hpf	0.0025, 200 mg/L	NPs e/ou agregados se acumulam no córion dos embriões mas não apresentam toxicidade evidente; duração e eficiência de eclosão permaneceram inalterados	Fent et al 2010 <sup>51</sup>	
CuO, TiO <sub>2</sub> , ZnO	<100 nm	FETAX (sapo)	96 hpf	500 mg/L	Exceto para CuO, não houve efeito letal aos embriões; aumento das taxas de malformações, principalmente intestinais; ZnO causou lesões à parede intestinal, TiO <sub>2</sub> apresentou baixa toxicidade aos embriões	Bacchetta et al 2012 <sup>52</sup>	
TiO <sub>2</sub>	-	Danio rerio (peixe)	post fertilization	-	NPs deTiO <sub>2</sub> causaram malformação e morte apenas quando os peixes em desenvolvimento foram iluminados (resposta tóxica dependente da luminosidade). O córion se torna uma barreira para a absorção até que os embriões eclodam	Bar-Ilan et al 2012 <sup>53</sup>	
ZnO	50-100 nm	Danio rerio (peixe)	fertilization-hatching	1-100 mg/L	Diminuição da taxa de eclosão; aumento da ocorrência de malformações: hiperemia, edema do pericárdio, deformações na cauda e na curvatura da coluna vertebral; estresse oxidativo; danos ao DNA	Zhao et al 2013 <sup>43</sup>	
Ag	5-35 nm	Paracentrotus lividus (ourijo-do-mar)	4-cell stage (48 hours)	0.03,0.3,3 mg/L	Embriões e larvas plutei apresentaram alterações no desenvolvimento concentração-dependentes	Siller et al 2013 <sup>44</sup>	
Au	0.8-1.6 nm	Danio rerio (fish)	4 h - 120 h post fertilization	0.08-50 mg/L	Olhos pequenos e pouco pigmentados; indução de apoptose ocular e da expressão de fatores de transcrição que regulam a pigmentação dos olhos e desenvolvimento.	Kim et al 2013 <sup>45</sup>	
TiMAT-Au					Alterações na morfologia do axônio podendo levar a comportamentos atípicos		
Ag	DW: 141.9±9.6 nm 77.9±1.2 nm (10 dias de vida)	Oryzias latipes (fish)	7-8 dev. stage embryos	5 mg/L	Aumento da mortalidade embrionária; diminuição da eclosão; anormalidades estruturais: coração tubular, ausência de olhos, anormalidades na membrana embrionária, deformidades da coluna vertebral, malformações do pericárdio e peritônio	Kim et al 2013 <sup>46</sup>	
Ag	TiO <sub>2</sub> 10-30 nm Co 28 nm	Paracentrotus lividus (sea urchin)	Soon post fertilization to larvae	0.0001-1 mg/L	Anormalidades no desenvolvimento, na fase de gástrula e pluteus, alterações morfológicas no eixo esquelético	Gambardella et al 2013 <sup>47</sup>	
Au	1.2 nm	Danio rerio (fish)	(4 hpf) to 120 hpf	0.08-50 mg/mL	D. rerio embrionário e larval toleram uma ampla gama de forças iônicas. À medida que a força iônica diminui, a mortalidade e as malformações aumentam (em embriões sem córion)	Truong et al 2012 <sup>49</sup>	
3-MPA-Au							



foi testada em peixes (peixes-paulistinha<sup>42,43,45,49,50,53,54,55</sup> e peixe japonês Medaka<sup>46</sup>), sapo (ensaio FETAX<sup>52</sup>), moluscos (ostras<sup>50</sup> e caracóis de água doce<sup>48</sup>), e embriões de ouriço do mar<sup>44,47</sup>. Como mostrado na Tabela 2, a exposição de embriões de animais não mamíferos a uma diversidade de NPs resulta em atrasos na eclosão, morfogênese anormal, aumento da mortalidade embrionária e outras anormalidades no desenvolvimento. Em alguns casos (por exemplo, utilizando fulereno C60) foi demonstrado que os efeitos nocivos sobre o embrião são gerados pelo estresse oxidativo provocado pelas NPs<sup>59</sup>. Fatores como a estabilidade das NPs no ensaio, a liberação local de íons e a tendência de algumas NPs de aglomerar<sup>x</sup> com a idade em certas condições experimentais devem ser levados em consideração durante a interpretação dos resultados dos testes. Também deve-se ter em mente que a toxicocinética e embriotoxicidade de NPs nos estágios iniciais de formação (predominantemente no estado singlete) e em estados mais tardios de formação (predominantemente aglomerados) podem diferir acentuadamente.

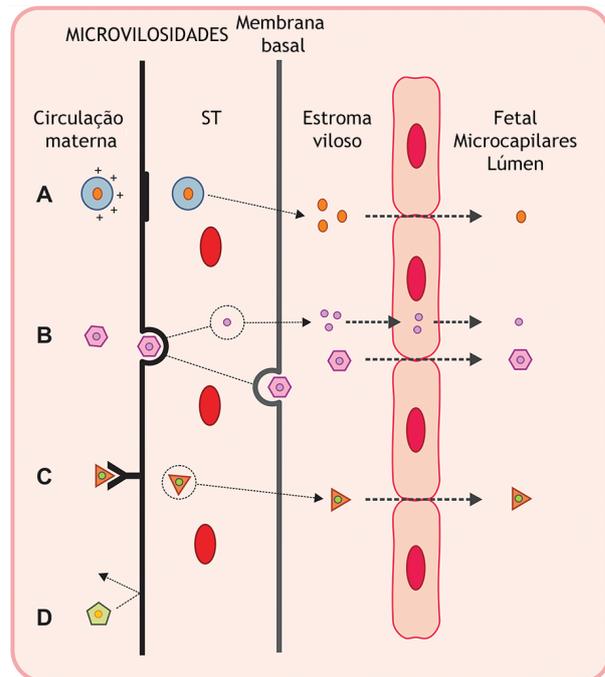
Uma questão chave na criação de uma estratégia de teste de toxicidade do desenvolvimento de uma NP é como equilibrar a relação custo-eficácia e a viabilidade, a fim de avaliar um número cada vez maior de produtos nanotecnológicos que são comercializados, através de ensaios ou medições multifásicas com valor preditivo dos riscos potenciais para embriões humanos.

Os ensaios com embriões do peixe-paulistinha são sensíveis, simples, rápidos e relativamente baratos. Visto que até mesmo o passo de descoloração dos ovos maduros é automatizado, um ensaio otimizado usando embriões de peixe-paulistinha por enquanto parece ser o teste *ex vivo* mais adequado para a ensaios de alta capacidade para avaliação dos riscos de NPs ao embrião<sup>58</sup>.

Alguns autores propuseram o teste de células-tronco embrionárias de rato (EST) como valiosa ferramenta *in vitro* para a triagem da toxicidade de NPs para o desenvolvimento<sup>60</sup>. Ao realizarem testes *in vivo* (rato) e *in vitro* (EST) sobre a toxicidade de nanotubos de carbono (SWCNTs) para embriões, Pietroiusti *et al.*<sup>61</sup> concluíram que o teste *in vitro* EST previu resultados *in vivo* e identificou as SWCNTs oxidadas como sendo mais tóxicas do que as não-oxidadas (cristalinas). Utilizando o teste EST, Park *et al.*<sup>62</sup> concluíram que NPs de sílica de 10 e 30 nm (tamanhos principais) inibiram a diferenciação concentração-dependente de células-tronco em cardiomiócitos contráteis, ao passo que NPs de sílica de 80 e 400 nm (tamanhos primários) não tiveram nenhum efeito até a maior concentração testada.

No entanto, o valor preditivo dos testes de toxicidade do desenvolvimento realizados em animais não-mamíferos, ou em células-tronco embrionárias de mamíferos *in vitro* (EST), é limitado. A placenta é um órgão alvo potencial de toxicidade das NPs e a interferência dos nanomateriais no desenvolvimento e função placentária pode eventualmente resultar em parto prematuro, retardo no desenvolvimento pré-natal, malformações congênitas e/ou perdas gestacionais<sup>63,64,65,66,67,68</sup>.

Considerando a ausência de disfunções placentárias ou perturbações na homeostase materna (ou seja, toxicidade



**Figura 1.** Mecanismos pelos quais as nanopartículas (NPs) e medicamentos carregados por NPs no sangue materno podem penetrar na placenta humana e atingir o embrião ou feto em desenvolvimento. A interface entre a circulação materna e o sangue embrionário/fetal envolve o sincitiotrofoblasto – ST (um sincício multinucleado terminalmente diferenciado formado pela fusão de citotrofoblastos), a matriz ou o tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas onde encontram-se os vasos sanguíneos, denominado estroma viloso (EV) e o revestimento endotelial de capilares fetais, formado por uma única camada de células achatadas. A – Fusão com a membrana do ST. NPs catiônicas e lipossomos no sangue materno podem se fundir com a membrana do ST e atingir o citoplasma, onde podem se separar, liberando o seu conteúdo diretamente no citosol do ST. Assim, o conteúdo das NPs pode se difundir no estroma viloso e na rede capilar do feto e entrar no lúmen capilar. Uma outra possibilidade (não mostrada) é as NPs ou lipossomos permanecerem intactos no citoplasma e se fundirem com a membrana basal (MB) do ST e liberar o seu conteúdo no estroma viloso. B – Endocitose. NPs podem ser internalizadas via endocitose e degradadas em endossomos, liberando o seu conteúdo no citosol do ST. Alternativamente, tais partículas podem ser transportadas via transcitose até o estroma viloso. Através de difusão simples, NPs (através de poros entre células endoteliais) ou o seu conteúdo (por meio de poros e através do citoplasma das células endoteliais) podem atingir o lúmen dos capilares fetais. C – Mecanismo mediado por receptor. NPs modificadas por ligantes podem se ligar a receptores da membrana apical do ST em processo de endocitose. Tais NPs podem posteriormente se separar de ligantes e liberar seu conteúdo no citosol do ST ou podem ser transferidas via transcitose ao estroma viloso. D – NPs com determinadas características em termos de dimensões, carga, e composição da superfície podem não conseguir penetrar na membrana apical da ST, e assim não serão transferidos do compartimento materno para o compartimento fetal. Em qualquer um dos casos de NPs que penetram na membrana apical do ST (A, B e C), uma outra possibilidade é a retenção de NPs intactas no citoplasma do ST.

x Agglomeration of nanoparticles (enlarging the real particle size) is known to be influenced by number, concentration and other physical factors.



**Tabela 3. Estudos sobre a toxicidade de nanopartículas para o desenvolvimento de espécies de mamíferos (roedores)**

Nanopartícula (NP) Tipo	Tamanho	espécie/ linhagem	Exposure		Estágio de desenvolvimento	Resultados do estudo	Referências
			Dose/via de exposição	Dose/via de exposição			
CdSe (QDs)	1-12 nm	Camundongo ICR	Blastocisto incubado in vitro e transferência de embriões	250 e 500 nmol/L (in vitro)	6, 9, 12 e 15 DG	Indução de apoptose (concentração-dependente), proliferação celular (massa celular interna) e desenvolvimento embrionário pós-implantação; aumento da taxa de reabsorção e diminuição do peso fetal	Chan & Shiao 2008 <sup>83</sup>
TiO <sub>2</sub>	2570 nm	Camundongo ICR	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto) e 7 e 14 DG	100 µg/fêmea/dia (sc)	6, 9, 12 e 15 DG	Microarranjo do tecido cerebral da prole: alterações na expressão de genes envolvidos na apoptose (em recém-nascidos), no desenvolvimento do cérebro e no estresse oxidativo (em filhotes). QDs transferidos das fêmeas ao feto	Shimizu et al 2009 <sup>75</sup>
CdTe/CdS (QDs) carbono	= 4 nm	Camundongo Kung-Ming	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	20, 50, 86 ou 125 µg Cd /animal (iv)	7 e 14 DG	Diminuição da produção espermiática diária da descendência masculina nas semanas 5 (47%), 10 (34%) e 15 (32%) após o nascimento.	Chu et al 2010 <sup>82</sup>
*TiO <sub>2</sub>	14 nm	Camundongo ICR	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	200 µg/fêmea (it)	7 e 14 DG	Diminuição da produção espermiática diária da descendência masculina nas semanas 5 (47%), 10 (34%) e 15 (32%) após o nascimento.	Yoshida et al 2010 <sup>71</sup>
MWCNT	21 nm	Camundongo C57BL/6	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	42 mg/m <sup>3</sup> 1 h/d aerosolized powder (ih)	GD 8-18	Toxicidade materna: inflamação pulmonar a longo prazo; comportamento da prole: comportamento cognitivo não alterado, comportamento em campo aberto alterado.	Hougaard et al 2010 <sup>72</sup>
SWCNTs (oxidada e não oxidada)	diâmetro de 10-15 nm comprimento ≅ 20 nm	Rato	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	0, 40, 200 and 1000 mg/kg bwt/d (po, gavage)	GD 6-19	Mínima toxicidade materna (redução da atividade locomotora, diminuição do peso do timo)	Lim et al 2011 <sup>74</sup>
*Negro de carbono	Modo de dist. comprimidos. = 90 nm	Camundongo CD-1	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	0.01 to 30 µg / mouse	GD 5.5	Nenhuma toxicidade embrionária ou fetal NOAEL materno de 200 mg/kg e fetal de 1000 µg/kg Placenta: lesões vasculares e aumento de espécies reativas de oxigênio (em fetos malformados, mas não em fetos normais)	Pietroliusti et al 2011 <sup>60</sup>
TiO <sub>2</sub>	14 nm (declarado)	Camundongo C57BL/6	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	11, 54, 268 µg/dam (cumulative dose) (it)	GD 7, 10, 15 e 18	Perdas de gestações precoces e malformações fetais (maior na prole exposta a NPs oxidadas), aumento de espécies reativas de oxigênio em fetos malformados, mas não em fetos normais	Jackson et al 2012 <sup>76</sup>
CdSe/Zn CdTe (QDs) MWCNT	90nm (70-110 nm)	Camundongo ICR	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	100 - 230 µg/m <sup>3</sup> 2, 5 horas a cada dois dias (ih)	GD 6, 9, 12 e 15	Microarranjo do fígado de recém-nascidos: sinalização celular, inflamação, ciclo celular e vias do metabolismo de lipídios afetados; fêmeas > machos.	Umezawa et al 2012 <sup>78</sup>
CdO	11-15 nm	Camundongo CD-1	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	5 mg / kg bwt (ip)	GD 6 or 13 ou 18	Microarranjo do tecido cerebral da prole masculina (16 DG e 2, 7, 14 e 21 DPN) com alterações na expressão gênica no córtex cerebral, bulbo olfatório e algumas regiões dopaminérgicas cerebrais.	Zalgevičienė et al 2012 <sup>79</sup>
MWCNT	comprimento = 295 ± 234 nm diâmetro = 10 ± 3 nm	Camundongo C57BL/6	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	A: 2,3.5 and 5 mg/kg bwt (ip) B: 3 mg/kg bwt (it)	GD 9	Não foram observados efeitos embriotóxicos ou teratogênicos em qualquer DG de exposição. Aumento dose-dependente na incidência de malformações, anomalias dos membros, ausência de cauda, costelas e arcos vertebrais fundidos.	Fujitani et al 2012 <sup>80</sup>
Au	3, 13 and 32 nm	Camundongo C57BL/6	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	100 - 230 µg/m <sup>3</sup> 2, 5 horas a cada dois dias (ih)	4,5-16,5 DG	Cds no útero, placenta e órgãos maternos, mas não detectado em fetos na concentração de 230 µg/m <sup>3</sup> ; diminuiu a proporção de grávidas expostas; diminuição do ganho de peso na gravidez e comprimento fetal, atraso no crescimento neonatal.	Blum et al 2012 <sup>81</sup>
ZnO	<100 nm	Rat	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	0, 9 µg/g: 0.9 µg/g (iv) dias (ih)	A: pré-concepção (PC) B: gravidez 8, 11, 15 e 18 DG 17 DG	Toxicidade materna: danos ao pulmão e fígado. Nenhuma mudança detectável em parâmetros gestacionais ou da prole.	Hougaard et al 2013 <sup>70</sup>
PEG-SWCNT	Modo de distr. comprimentos = 90 nm	Camundongo CD-1	Gravidez tardia (1-5 dias antes do parto)	A: 64 µg/fêmea (dose cumulativa) (it) B: 268 µg/fêmea (dose cumulativa) (it)	14 dias pré-acasalamento até PN4 5,5 DG (A) 5,5; 8,5; 11,5; 15,5 DG (B)	acúmulo de Au3 e Au13 aumentou com a injeção intraterrina de LPS em 16 DG Em fetos, os níveis de Au3 foram maiores do que os níveis de Au13	Tian et al 2013 <sup>73</sup>
						Aumento da mortalidade embrionária, diminuição do número e peso corporal da prole; Zn presente em glândulas mamárias em fêmeas, e no fígado e rins na prole. Nenhum efeito até a concentração de 10 µg/animal; Na concentração de 30 µg/animal (A e B), foram observados efeitos teratogênicos associados a danos na placenta; toxicidade hepática nas fêmeas (B) NPs detectadas no embrião quando a exposição ocorreu em 5,5 DG; exposição em DGs posteriores: NPs presentes na placenta e saco vitelino, mas não no embrião.	Jo et al 2013 <sup>77</sup>
							Campagnolo et al 2013 <sup>84</sup>

MWCNTs: Nanotubos de carbono multicamadas. Legenda: it: instilação endotraqueal; ih: inalação; iv: infecção endotraqueal; DPN: dias pós nascimento; DG: dias de gestação. \* Rutilo alongado de dióxido de titânio (TiO2) com tamanho médio de cristalito de 21 nm, modificado com Al, Si e Zr, e revestido com polialcoois (filtro UV do tipo Titan L181 para nanopartículas). b Printex 90, tamanho geométrica de 65 nm (esferas de carbono).



Tabela 4. Diferenças interespecíficas na morfologia e função placentária.

Característica	Roedores		Primatas	
	Ratos	Camundongos	Macaco Rhesus	Humanos
Duração da gestação (dias)	22	19	166	266
Implantação (DG)	5-6	5	9	6-7
Implantação				
inicial	excêntrica	excêntrica	superficial	intersticial
tardia	intersticial	intersticial		
Forma	discoide	discoide	bidiscoide	discoide
Placenta (Membrana fetal)				
inicial	saco vitelino invertido	saco vitelino invertido	corioalantóide	corioalantóide
definitiva	corioalantóide	corioalantóide	corioalantóide	corioalantóide

Tipos de implantação: 1) superficial: saco coriônico encontra-se em contato com lúmen uterino; 2) excêntrica: saco coriônico encontra-se em um compartimento parcialmente separado do lúmen uterino; 3) intersticial: saco coriônico encontra-se dentro da parede uterina e perde o contato com o lúmen uterino. Placenta corioalantóide: formada pelo córion (membrana avascular mais externa da vesícula embrionária), que é estimulado e recebe vascularização do alantóide. Placenta com saco vitelino invertido: formada por membranas de grandes sacos vitelinos de roedores, é às vezes chamado de “invertido” porque membranas vitelinas externas se tornam descontínuas em aposição à parede uterina, deixando a membrana do saco vitelino interior quase em contato com o lúmen e epitélio uterinos. Os roedores só desenvolvem a placenta corioalantóide definitiva depois que o sistema circulatório está funcional (em ratos, com 11-11,5 DG), enquanto que placentas de saco vitelino não são formados em primatas.

materna), os efeitos adversos de NPs no desenvolvimento pré-natal ocorrem pela transferência de NPs da placenta ao compartimento embrionário/fetal (Figura 1).

Em sistemas de teste em animais não-mamíferos, os ovos e embriões estão diretamente expostos e portanto estes ensaios não são capazes de antecipar os efeitos indiretos das NPs (mediados por via materna ou placentária). Além disso, para aumentar a sensibilidade do teste, as possíveis barreiras à penetração de substâncias teste no ovo são removidas, assim como o córion é removido no ensaio com o peixe-paulistinha e a camada gelatinosa dos embriões no teste FETAX (rã)<sup>69,xi</sup>. Portanto, o teste com peixe paulistinha e outros testes em animais não-mamíferos conseguem detectar possíveis substâncias tóxicas ao desenvolvimento que não alcançariam os embriões de mamíferos devido às funções protetoras da placenta e organismo materno, mas não conseguem detectar efeitos nocivos resultantes da toxicidade materna e disfunção placentária. Em outras palavras, os testes em animais não mamíferos ou *in vitro* nos quais a exposição dos embriões às NPs não ocorre através da placenta podem gerar resultados falso-negativos e falso-positivos com relação aos riscos potenciais para o desenvolvimento em mamíferos.

### Transferência transplacentária e toxicidade para embriões de mamíferos

Estudos cinéticos de compostos xenobióticos clássicos sugerem que moléculas altamente hidrofílicas e com alta massa molecular (> 1 kDa) não são transferidas ao embrião através da placenta<sup>xii</sup>. No entanto, como destacado por Maynard et al.<sup>29</sup>, devido às mudanças drásticas nas interações com sistemas bio-

lógicos dependentes do tamanho das NPs, a toxicidade das NPs criadas artificialmente pode ocorrer devido à penetração passiva de partículas e fibras em tecidos normalmente inacessíveis a moléculas e partículas grandes<sup>29</sup>.

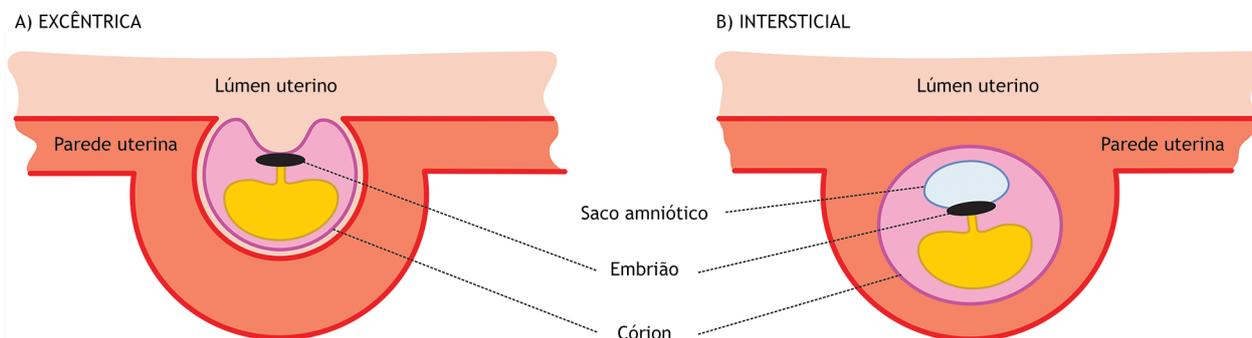
Como demonstrado por estudos descritos na tabela 3, a exposição materna à uma variedade de NPs foi associada a efeitos prejudiciais aos embriões de camundongos e ratos<sup>61,70,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84</sup>. Em pelo menos três estudos<sup>73,77,82,xiii</sup> NPs foram detectados na prole exposta na fase pré-natal, demonstrando que as NPs testadas foram transferidas aos embriões através da placenta. No entanto, Blum et al. 81 detectaram NPs (CsO) na placenta e órgãos maternos de camundongos tratados mas não em fetos. Portanto, os efeitos embriotóxicos de NPs de CsO apontados pelos autores (por exemplo, atraso no crescimento fetal e neonatal) foram provavelmente secundários aos efeitos sobre a placenta e/ou toxicidade materna (Tabela 3).

Em geral, os estudos com roedores realizados até o momento indicaram que a exposição de fêmeas grávidas a diferentes tipos de NPs pode resultar em uma variedade de efeitos adversos à gravidez, como a mortalidade embrionária, atraso no desenvolvimento intra-uterino, anomalias estruturais e expressão gênica alterada na prole exposta durante a fase intra-uterina (Tabela 3). Outros estudos forneceram dados cinéticos adicionais que sugerem que NPs tóxicas atravessaram a placenta e atingiram os embriões. No entanto, em pelo menos um caso os efeitos embriotóxicos das NPs parece ter sido secundário à toxicidade materna e/ou da placenta<sup>81</sup>. A ausência de efeitos adversos ao desenvolvimento do embrião, mesmo quando a exposição a NPs resultou em toxicidade materna

xi In the FETAX assay<sup>69</sup> after frog egg laying, the jelly coat (a thick, sticky coating surrounding the egg) is removed by gently swirling the egg mass with a solution of L-cysteine. This de-jellying of embryos is undertaken to facilitate xenobiotic penetration of the egg thereby enhancing assay sensitivity to developmental toxicants.

xii Exceptions to this rule are large macromolecules specifically transported by the syncytiotrophoblast, for example IgG (from the 13<sup>th</sup> week of human pregnancy onwards).

xiii In Jo et al's study, pups underwent euthanasia on PND4 and so transference of NPs to pups via the maternal milk cannot be ruled out in this case.



**Figura 2.** Diferenças entre os tipos de placentação excêntrica (roedores) e intersticial (humanos). Note-se que na placentação excêntrica, o saco coriônico está dentro de um compartimento que encontra-se parcialmente em contato com o lúmen uterino, ao passo que no tipo intersticial o saco coriônico é totalmente envolto pela parede uterina e não mantém contato com o lúmen uterino.

acentuada, também foi relatada<sup>79</sup>. Em um estudo realizado por Chan & Shiao<sup>83</sup> blastocistos de rato foram expostos às NPs do tipo CdS e QDs *in vitro* e em seguida implantados no útero. Neste estudo os autores observaram os feitos prejudiciais destas NPs no desenvolvimento embrionário, tanto *in vitro* (através de apoptose de células de blastocistos) como *in vivo* após a transferência e implantação *in vitro* de embriões.

Devido às diferenças na estrutura e função placentária entre espécies, os efeitos tóxicos das NPs sobre o desenvolvimento de roedores talvez não ocorram em humanos<sup>85</sup> (Tabelas 4,5, Figura 2). No rato o saco vitelino visceral invertido (intimamente aposto aos tecidos uterinos) é a principal estrutura que medeia as trocas materno-embriônicas no início da gravidez (DG 7,5-12)<sup>85,86</sup>. No entanto, em humanos não há nenhuma indicação de que a nutrição histiotrófica (através do saco vitelino) é uma via importante para a aquisição de nutrientes e trocas hemotrópicas<sup>86</sup>. Em roedores também foi demonstrado que as substâncias que inibem a função do saco vitelino, tais como o azul de tripano e a concanavalina A, também são teratogênicas<sup>87,88</sup>. Sendo assim, as diferenças entre espécies na estrutura e função da placenta sugerem que os inibidores de trocas materno-embriônicas mediadas pelo saco vitelino em roedores não provoquem efeitos teratogênicos semelhantes em seres humanos. Embora esta seja uma explicação para alguns dos efeitos embriotóxicos mostrados na Tabela 3, o efeito das NPs nas trocas materno-embriônicas e o grau de inibição pelas NPs não foram totalmente elucidados.

Atualmente pouco se sabe sobre o transporte de NPs através da placenta e se as NPs interferem em funções placentárias em humanos<sup>64,65</sup> e apenas alguns estudos abordaram estas questões. Myllynen et al.<sup>67</sup> observaram que NPs de ouro peguilhadas<sup>xiv</sup> (de 10 a 30 nm de diâmetro) não atravessaram (em quantidades detectáveis, através de ICP-MS) a placenta humana perfusada *ex vivo* durante um teste de perfusão de 6 h. Os autores também

**Tabela 5.** Diferenças funcionais entre o saco vitelino invertido e a placenta corioalantóide.

Estrutura da placenta	Características funcionais
Saco vitelino invertido (roedores: início da gravidez)	As trocas materno-fetais ocorrem por processo histiotrófico; as células epiteliais do saco vitelino realizam pinocitose (processo lisossomo-dependente) de macromoléculas encontradas nas secreções do útero materno
Corioalantóide (primatas, e definitiva em roedores; após 11-11,5 DG em ratos)	As trocas materno-fetais ocorrem por processo hemotrófico direto

A troca de nutrientes na placenta corioalantóide através de processo hemotrófico é mais rápida e eficiente do que a troca mediada por processo histiotrófico no saco vitelino invertido

observaram que NPs de ouro foram absorvidas pela camada de células de sincitiotrofoblasto (possivelmente através de endocitose não-específica), o que sugere que a placenta é capaz de sequestrar estas NPs. Wick et al.<sup>68</sup> também usaram um método de perfusão placentária *ex vivo* por 6 h aplicada na direção materno-fetal para investigar o transporte placentário de esferas de poliestireno de 50 a 500 nm marcadas por fluorescência. Os resultados do estudo mostraram que NPs de poliestireno menores que 240 nm exibiram uma capacidade tamanho-dependente de atravessar a placenta, no sentido da circulação fetal. Aparentemente o processo de transferência é saturável e envolve um mecanismo de endocitose. Um estudo recente de Sønnegaard-Poulsen et al.<sup>66</sup> utilizando o ensaio de citotoxicidade MTT em um modelo *in vitro* (clone b30 da linhagem BeWo de coriocarcinoma) e um modelo *ex vivo* (placenta humana perfundida) descobriram que NPs de sílica em concentrações superiores a 100 µg/ml diminuíram a viabilidade de células BeWo. Os autores também observaram que a

xiv PEGylation is a covalent attachment of polyethylene glycol (PEG) polymer chains to NP or another molecule. The covalent attachment of PEG to a drug or therapeutic protein can “mask” the NP or macromolecule from the host’s immune system, increase its water solubility and hydrodynamic size (size in solution), and reduce its renal clearance, thereby prolonging its circulatory time.

xv Kaitu’u-Lino et al.<sup>89</sup> used bacterially derived nanospheres (400nm in diameter) known as “EnGeneIC Delivery Vehicles” (EDVs) to target the epidermal growth factor receptor (EGFR) and so promote trophoblast tissue specific delivery of the antineoplastic drug doxorubicin. Placental targeting was achieved with the presence of bispecific antibodies against EGFR on the sphere surface. Since EGFRs are highly expressed on the placenta surface, doxorubicin (an antiproliferative agent) was specifically delivered to the target abnormal tissue. It is of note that these EDV are larger than 100 nm in diameter, and so technically they do not fit the previous (arbitrary) definition of NP.



percentagem de NPs de sílica que atingiu o perfusato fetal após 6 h foi limitada a 4,2 e 4,6%, para NPs de 25 e 50 nm, respectivamente, o que sugere que as NPs são fracamente transportadas através de células BeWo<sup>66</sup>.

Por outro lado, o transporte seletivo de NPs à placenta e embrião eventualmente pode ser útil para o tratamento de condições médicas com risco de vida envolvendo o crescimento anormal de trofoblastos, tais como a gravidez ectópica, coriocarcinoma e *placenta accreta*. Em consonância com isso, Kaitu'u-Lino et al.<sup>89</sup> usaram NPs<sup>xv</sup> carregadas com doxorubicina para fornecer este medicamento quimioterápico ao tecido placentário. Os autores demonstraram que o transporte de NPs + doxorubicina ao alvo induziu uma regressão acentuada em tumores xenógrafos em células JEG-3 de coriocarcinoma em camundongos SCID. Estes mesmos autores também mostraram que NPs direcionadas ao receptor EGFR foram rapidamente incorporadas por explantes de placenta humana *ex vivo* e induziram apoptose. Em um ensaio *in vitro* usando células JEG-3 estas NPs causaram inibição de viabilidade e da proliferação celular e aumento da apoptose. No geral os resultados de laboratório sugerem que esta é uma abordagem terapêutica viável para novos ensaios clínicos em pacientes do sexo feminino com distúrbios no crescimento do epitélio trofoblástico.

## Conclusões

Embora necessária para avaliar os riscos de saúde nas mulheres, as avaliações de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento de NPs permanecem aquém da rápida expansão do número e aplicações de novos produtos nanotecnológicos recentemente introduzidos no mercado.

Como mostrado nas Tabelas 2 e 3, os estudos experimentais realizados até agora indicaram que vários tipos de NPs podem ter efeitos adversos ao desenvolvimento embrionário de invertebrados como ouriços do mar, ostras e caramujos de água doce, de vertebrados não mamíferos (peixes e sapos) e de mamíferos (ratos e camundongos). Além disso, alguns estudos em roedores encontraram evidências de que algumas NPs tóxicas atravessaram a placenta e atingiram o compartimento do embrião/feto. No entanto, as diferenças no desenvolvimento e na função placentária no início da gravidez entre diferentes espécies (por exemplo, saco vitelino invertido em ratos em relação às vilosidades coriônicas em humanos) torna inviável a extrapolação dos resultados de roedores para humanos. Com exceção dos estudos *ex vivo* utilizando placentas perfusadas, pouco sabemos a respeito da capacidade da placenta humana de incorporar e transferir NPs ao embrião/feto. Até onde sabemos não há estudos de toxicidade para o desenvolvimento de NPs em primatas não-humanos e em outros mamíferos além de roedores.

Vários problemas e dúvidas precisam de ser resolvidos antes de se planejar uma estratégia de pesquisa ou de testes multifásicos para elucidar os potenciais riscos ao desenvolvimento através da utilização de novos produtos nanotecnológicos.

Uma das maiores dificuldades é que os nanomateriais em uso e em fase de desenvolvimento são constituídos de uma diversidade de NPs. Como destacado por Clark et al.<sup>90</sup>, mesmo dentro de uma única classe de NPs, tais como NPs à base de carbono ou de óxido metálicos, há uma ampla gama de tamanhos e conformações, com composições químicas diferentes e modificações de superfície, que podem afetar o seu comportamento e toxicidade. Portanto, a caracterização destas partículas caso-a-caso parece inviável para avaliar os riscos de desenvolvimento e reprodutivo, principalmente se forem feitos testes *in vivo* em mamíferos. Além disso, os dados experimentais disponíveis são limitados, o que nos impede de fazer generalizações confiáveis com base em classes, tamanhos, conformações ou outras características das NPs, bem como em generalizar sobre os riscos atribuídos a um subconjunto específico de NPs. Em outras palavras, considerando que modelos computacionais QSAR (Quantitative Structure/Activity Relationship) para identificar os riscos reprodutivos e de desenvolvimento de moléculas químicas individuais ainda estão em desenvolvimento<sup>91</sup>, a criação de modelos preditivos semelhantes *in silico* para identificar alertas estruturais de NPs (envolvendo combinações de tamanhos, conformações, composições químicas e outras características) é provavelmente inatingível em um futuro próximo.

Outra questão a considerar é a heterogeneidade no tamanho e a instabilidade de algumas NPs em soluções fisiológicas. Como mencionado anteriormente, sob certas condições experimentais elas tendem a se aglomerar com o tempo. Além disso, foi demonstrado que a toxicidade pulmonar, citotoxicidade e embriotoxicidade de NPs novas (predominantemente singletes) por vezes pode diferir da toxicidade de NPs mais velhas (predominantemente aglomeradas)<sup>49,92,93</sup>. A oxidação e liberação de íons de NPs metálicas também podem influenciar a sua toxicidade.

Finalmente, uma outra dificuldade na produção de uma estratégia de teste é o valor preditivo limitado de ensaios *in vitro* (e.g., teste de células-tronco embrionárias) e *ex vivo* (em peixes-paulistinha), que são testes de rastreio de elevada capacidade para detectar a toxicidade para o desenvolvimento de NPs. Estes testes não conseguem detectar efeitos adversos sobre o desenvolvimento embrionário de mamíferos que surgem indiretamente de um efeito tóxico materno e/ou disfunções placentárias causadas por NPs. Vale enfatizar que, em ensaios multifásicos projetados para economizar tempo e recursos, um primeiro resultado negativo tende a ser definitivo porque via de regra a substância não será testada posteriormente *in vivo*. No entanto, um resultado positivo na primeira fase de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* geralmente permite a confirmação através de testes *in vivo* em roedores (segunda fase).

As diferenças entre os roedores e seres humanos com respeito à estrutura e função da placenta, particularmente no início da gravidez, eventualmente podem conduzir a resultados falso-positivos neste passo dos testes de confirmação. Por isso mais estudos sobre o transporte e efeitos das NPs no desenvolvimento da placenta humana e seu funcionamento são necessários.



Nesta revisão o foco dos autores foi principalmente a avaliação dos riscos potenciais ao desenvolvimento apresentados por NPs, o que constitui o primeiro passo da avaliação de risco (identificação de riscos). No entanto, é importante ressaltar que faltam análises quantitativas confiáveis de exposição humana (incluindo mulheres em idade fértil) às NPs existentes, e sem essas informações é impossível avaliar adequadamente e gerenciar os riscos à saúde.

A identificação e avaliação de potenciais riscos à saúde humana oriundos de produtos nanotecnológicos é um dos desafios atualmente enfrentados pelos toxicologistas, especialmente aqueles que lidam com toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento. De fato, qualquer utilização segura desta fascinante tecnologia na medicina e em produtos de consumo exige uma abordagem de testes toxicológicos igualmente inovadora.

### Agradecimentos

Os autores são gratos à Heloisa Maria Nogueira Diniz e Genilton José Vieira por prepararem as figuras.

### Referências

1. Toumey C. Reading Feynman into nanotechnology: A text for a new science. *Techné*. 2008;12(3):133-68.
2. Service RF. Nanotoxicology. *Nanotechnology growths up*. Science. 2004;304(5678):1732-4.
3. Drexler KE. Nanotechnology: the past and the future. *Science*. 1992;255(5042):268-9.
4. Whatmore RW. Nanotechnology: What is it? Should we be worried? *Occup Med (London)*. 2006;56(5):295-9.
5. McCray WP. "Will Small Be Beautiful? Making Policies for Our Nanotech Future". *History and Technology*. 2005;21(2):177-203.
6. Plentz F, Fazzio A. Considerações sobre o Programa Brasileiro de Nanotecnologia. *Ciência e Cultura*. 2013;65(3):23-7.
7. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia [Internet]. Brasília: MCTI; 2003. [cited 08 Sep 2013]. Available from: [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0002/2361.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0002/2361.pdf)
8. Maynard AD. Don't define nanomaterials. *Nature*. 2011;475(7354):31.
9. Code of Federal Regulation (US). Title 29 - Labor: Subtitle B - Regulations Relating to Labor: Chapter XVII - Occupational safety and health administration, Department of labor: Part 1910 - Occupational safety and health standards: Subpart Z - Toxic and Hazardous Substances [internet]. Washington: CRF; 2006. [cited 01 Nov 2013]. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2006-title29-vol6/pdf/CFR-2006-title29-vol6-part1910.pdf>.
10. Morigi V, Tocchio A, Bellavite Pellegrini C, Sakamoto JH, Arnone M, Tasciotti E. Nanotechnology in medicine: from inception to market domination. *J Drug Deliv*. 2012;2012:389485.
11. Thorley AJ, Tetley TD. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther*. 2013;140(2):176-85.
12. Varshney HM, Shailender M. Nanotechnology" Current Status in Pharmaceutical Science: a review. *Int J Ther Appl*. 2012;6:14-24.
13. Date AA, Patil RR, Panicucci R, Souto EB, Lee RW. Translating nanotechnology from bench to pharmaceutical market: barriers, success, and promises. *J Drug Deliv*. 2012;2012:678910.
14. Kesiosoglou F, Panmai S, Wu Y. Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(7):631-44.
15. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm*. 2006;3(6):631-43.
16. Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int J Pharm*. 2008;347(1-2):93-101.
17. Rios-Doria J, Carie A, Costich T, Burke B, Skaff H, Panicucci R, Sill K. A versatile polymer micelle drug delivery system for encapsulation and in vivo stabilization of hydrophobic anticancer drugs. *J Drug Deliv*. 2012;2012:951741.
18. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1996; 46(12 Pt 1):6387-92.
19. Sengupta P, Basu S, Soni S, Pandey A, Roy B, Oh MS, Chin KT, Paraskar AS, Sarangi S, Connor Y, Sabbiseti VS, Koppa-ram J, Kulkarni A, Muto K, Amarasiriwardena C, Jayawardene I, Lupoli N, Dinulescu DM, Bonventre JV, Mashelkar RA, Sengupta S. Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(28):11294-9.
20. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 1995; 55(17):3752-6.
21. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-80.
22. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(1):102-11.
23. Powell AC, Paciotti GF, Libutti SK. Colloidal gold: a novel nanoparticle for targeted cancer therapeutics. *Methods Mol Biol*. 2010;624:375-84.
24. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR Jr, Gannon WE, Walker M, Seidel GD, Yuldasheva N, Tamarkin L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):6139-49.
25. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. Nanotoxicology. *Occup Environ Med*. 2004;61(9):727-8.



26. Seaton A, Donaldson K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *Lancet*. 2005;365(9463):923-4.
27. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113(7):823-39.
28. Kurath M, Maasen S. Toxicology as a nanoscience? Disciplinary identities reconsidered. *Part Fibre Toxicol*. 2006;3:6.
29. Maynard AD, Warheit DB, Philbert MA. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicol Sci*. 2011;120 Suppl 1:S109-29.
30. Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*. 2000;(96):5-74; disc. 75-86.
31. Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001;74(1):1-8.
32. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2002;65(20):1531-43.
33. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004;16(6-7):437-45.
34. Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelshtein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 1992;97:193-9.
35. Ferin J. Pulmonary retention and clearance of particles. *Toxicol Lett*. 1994;72(1-3):121-5.
36. Silbergeld EK, Contreras EQ, Hartung T, Hirsch C, Hogberg H, Jachak AC, Jordan W, Landsiedel R, Morris J, Patri A, Pounds JG, de Vizcaya Ruiz A, Shvedova A, Tanguay R, Tatarazako N, van Vliet E, Walker NJ, Wiesner M, Wilcox N, Zurlo J.  $\square$  workshop report. Nanotoxicology: "the end of the beginning" - signs on the roadmap to a strategy for assuring the safe application and use of nanomaterials. *AL-TEX*. 2011;28(3):236-41.
37. Kante B, Couvreur P, Dubois-Krack G, De Meester C, Guiot P, Roland M, Mercier M, Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles. *J Pharm Sci*. 1982;71(7):786-90.
38. Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*. 2010;30(3):343-52.
39. Campagnolo L, Massimiani M, Magrini A, Camaioni A, Pietroiusti A. Physico-chemical properties mediating reproductive and developmental toxicity of engineered nanomaterials. *Curr Med Chem*. 2012;19(26):4488-94.
40. Sun J, Zhang Q, Wang Z, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9319-37.
41. Juch H, Nikitina L, Debbage P, Dohr G, Gauster M. Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues. *Reprod Toxicol*. 2013;41:73-9.
42. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XH. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*. 2007;1(2):133-43.
43. Zhao X, Wang S, Wu Y, You H, Lv L. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2013;136-137:49-59.
44. Siller L, Lemloh ML, Piticharoenphun S, Mendis BG, Horrocks BR, Brümmer F, Medaković D. Silver nanoparticle toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Pollut*. 2013;178:498-502.
45. Kim KT, Zaikova T, Hutchison JE, Tanguay RL. Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation. *Toxicol Sci*. 2013;133(2):275-88.
46. Kim JY, Kim KT, Lee BG, Lim BJ, Kim SD. Developmental toxicity of Japanese medaka embryos by silver nanoparticles and released ions in the presence of humic acid. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013;92:57-63.
47. Gambardella C, Aluigi MG, Ferrando S, Gallus L, Ramoino P, Gatti AM, Rottigni M, Falugi C. Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. *Aquat Toxicol*. 2013;130-131:77-85.
48. Musee N, Oberholster PJ, Sikhwivhilu L, Botha AM. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere*. 2010;81(10):1196-203.
49. Truong L, Zaikova T, Richman EK, Hutchison JE, Tanguay RL. Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle exposure. *Nanotoxicology*. 2012;6(7):691-9.
50. Ringwood AH, Levi-Polyachenko N, Carroll DL. Fullerene exposures with oysters: embryonic, adult, and cellular responses. *Environ Sci Technol*. 2009;43(18):7136-41.
51. Fent K, Weisbrod CJ, Wirth-Heller A, Pielers U. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Aquat Toxicol*. 2010;100 (2):218-28.
52. Bacchetta R, Santo N, Fascio U, Moschini E, Freddi S, Chirico G, Camatini M, Mantecca P. Nano-sized CuO, TiO<sub>2</sub> and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*. 2012;6(4):381-98.
53. Bar-Ilan O, Louis KM, Yang SP, Pedersen JA, Hamers RJ, Peterson RE, Heideman W. Titanium dioxide nanoparticles produce phototoxicity in the developing zebrafish. *Nanotoxicology*. 2012;6(6):670-9.
54. Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem*. 2007;26(4):708-16.
55. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XH. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single



- silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*. 2007;1(2):133-43.
56. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253-310.
57. Henn K, Braunbeck T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;153(1):91-8.
58. Mandrell D, Truong L, Jephson C, Sarker MR, Moore A, Lang C, Simonich MT, Tanguay RL. Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens. *J Lab Autom*. 2012;17(1):66-74.
59. Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;229(1):44-55.
60. Campagnolo L, Fenoglio I, Massimiani M, Magrini A, Pietroiusti A. Screening of nanoparticle embryotoxicity using embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2013;1058:49-60.
61. Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L. Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS Nano*. 2011;5(6):4624-33.
62. Park MV, Annema W, Salvati A, Lesniak A, Elsaesser A, Barnes C, McKerr G, Howard CV, Lynch I, Dawson KA, Piersma AH, de Jong WH. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;240(1):108-16.
63. Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*. 2005;26(5):361-71.
64. Menezes V, Malek A, Keelan JA. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(5):731-42.
65. Saunders M. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Ver Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1(6):671-84.
66. Sønnegaard Poulsen M, Mose T, Leth Maroun L, Mathiesen L, Ehlert Knudsen L, Rytting E. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. *Nanotoxicology*. 2013. [Ahead of print]. doi: 10.3109/17435390.2013.812259
67. Myllynen PK, Loughran MJ, Howard CV, Sormunen R, Walsh AA, Vähäkangas KH. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol*. 2008;26(2):130-7.
68. Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, von Mandach U. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect*. 2010;118(3):432-6.
69. Leconte I, Mouche I. Frog embryo teratogenesis assay on *Xenopus* and predictivity compared with in vivo mammalian studies. *Methods Mol Biol*. 2013;947:403-21.
70. Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A, Verleysen E, Madsen AM, Saber AT, Pojana G, Mast J, Marcomini A, Jensen KA, Wallin H, Szarek J, Mortensen A, Vogel U. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. *Reprod Toxicol*. 2013;41:86-97.
71. Yoshida S, Hiyoshi K, Oshio S, Takano H, Takeda K, Ichinose T. Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring. *Fertil Steril*. 2010;93(5):1695-9.
72. Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Löschner K, Larsen EH, Birkedal RK, Vibenholt A, Boisen AM, Wallin H, Vogel U. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:16.
73. Tian X, Zhu M, Du L, Wang J, Fan Z, Liu J, Zhao Y, Nie G. Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy. *Small*. 2013;9(14):2432-9.
74. Lim JH, Kim SH, Shin IS, Park NH, Moon C, Kang SS, Kim SH, Park SC, Kim JC. Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2011;92(1):69-76.
75. Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:20.
76. Jackson P, Hougaard KS, Vogel U, Wu D, Casavant L, Williams A, Wade M, Yauk CL, Wallin H, Halappanavar S. Exposure of pregnant mice to carbon black by intratracheal instillation: toxicogenomic effects in dams and offspring. *Mutat Res*. 2012;745(1-2):73-83.
77. Jo E, Seo G, Kwon JT, Lee M, Lee Bc, Eom I, Kim P, Choi K. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. *J Toxicol Sci*. 2013;38(4):525-30.
78. Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J Toxicol Sci*. 2012;37(6):1247-52.
79. Zalgevičienė V, Kulvietis V, Bulotienė D, Didžiapetrienė J, Rotomskis R. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(5):256-64.
80. Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A. Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. *J Toxicol Sci*. 2012;37(1):81-9.
81. Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C, Zelikoff JT. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci*. 2012;126(2):478-86.
82. Chu M, Wu Q, Yang H, Yuan R, Hou S, Yang Y, Zou Y, Xu S, Xu K, Ji A, Sheng L. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small*. 2010;6(5):670-8.



83. Chan WH, Shiao NH. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29(2):259-66.
84. Campagnolo L, Massimiani M, Palmieri G, Bernardini R, Sacchetti C, Bergamaschi A, Vecchione L, Magrini A, Bottini M, Pietroiusti A. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10(1):21.
85. Carney EW, Scialli AR, Watson RE, DeSesso JM. Mechanisms regulating toxicant disposition to the embryo during early pregnancy: an interspecies comparison. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004; 72(4):345-60.
86. Freyer C, Renfree MB. The mammalian yolk sac placenta. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009; 312(6):545-54.
87. Williams KE, Roberts G, Kidston ME, Beck F, Lloyd JB. Inhibition of pinocytosis in rat yolk sac by trypan blue. *Teratology.* 1976;14(3):343-54.
88. Gulamhusein AP, Moore WJ, Gupta M, Beck F. Trypan blue teratogenesis in the rat: further observations in vitro. *Teratology.* 1982; 26(3):289-97.
89. Kaitu'u-Lino TJ, Pattison S, Ye L, Tuohey L, Sluka P, MacDiarmid J, Brahmabhatt H, Johns T, Horne AW, Brown J, Tong S. Targeted nanoparticle delivery of doxorubicin into placental tissues to treat ectopic pregnancies. *Endocrinology.* 2013;154(2):911-9.
90. Clark KA, White RH, Silbergeld EK. Predictive models for nanotoxicology: current challenges and future opportunities. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;59(3):361-3.
91. Matthews EJ, Kruhlak NL, Daniel Benz R, Contrera JF. A comprehensive model for reproductive and developmental toxicity hazard identification: I. Development of a weight of evidence QSAR database. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;47(2):115-35.
92. Gualtieri M, Skuland T, Iversen TG, Låg M, Schwarze P, Bilaničová D, Pojana G, Refsnes M. Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology.* 2012;6(7):700-12.
93. Zook JM, Maccuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology.* 2011;5(4):517-30.

Data de recebimento: 15/09/2013

Data de aceite: 27/11/2013