UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SORAIA FERREIRA BEZERRA

Aplicação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais

Goiânia
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor

Soraia Ferreira Bezerra

3. Título do trabalho

Aplicação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **SORAIA FERREIRA BEZERRA**, **Discente**, em 05/06/2020, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Marize Campos Valadares**, **Professor do Magistério Superior**, em 08/06/2020, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1370884** e o código CRC **D8CD6928**.

Referência: Processo nº 23070.026107/2020-10 SEI nº 1370884

SORAIA FERREIRA BEZERRA

Aplicação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Goiânia

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira Bezerra, Soraia
Aplicação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais [manuscrito] / Soraia Ferreira Bezerra, Marize Campos Valadares. - 2019.
14, 65 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marize Campos valadares.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), , Goiânia, 2019.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Caracterização de nanomateriais. 2. metodologias inovadoras. 3. alergenicidade. 4. quantificação de IL8. I. Campos Valadares, Marize . II. Campos valadares, Marize, orient. III. Título.

CDU 615.1

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia/UFG

ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Soraia Ferreira Bezerra. Na data de **30 de maio de 2019**, às **09:00 horas**, na sala **de aula do Programa/anexo II da Faculdade de Farmácia** da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: **Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG), Dra. Thaís Leite Nascimento (FF/UFG), Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG) e Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva (Uni-Anhanguera) como suplente**. Sob a Presidência da Orientadora, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: **"Métodos inovadores aplicados na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais",** de autoria de **Soraia Ferreira Bezerra**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de **Mestrado**. A sessão foi aberta pela presidente da Banca, **Profa. Dra. Marize Campos Valadares**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida **à pós-graduanda** que, em 30 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A **Dissertação** foi considerada aprovada pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, **a pós-graduanda** poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 20 minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, **Fernanda Maura Ferreira Bellato**, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Parecer Detalhado da Banca Examinadora

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG) - Presidente	Aprovada	
Dr. Thaís Leite Nascimento (FF/UFG)	Aprovada	
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)	APROVADA	
Dr. Luís Antônio Dantas Silva (Uni-Anhanguera)- Suplente		
Parecer Final	**Aprovado/ Reprovado**	Aprovada

Alteração do título:
Aplicação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais

Soraia Ferreira Bezerra

Soraia Ferreira Bezerra

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dra Marize Campos Valadares

Goiânia-GO

2019

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Soraia Ferreira Bezerra

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Profa. Dra. Thais Leite Nascimento

Pós doutoranda Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Luiz Carlos Cunha

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Profa. Dr. Luiz Antônio Dantas Silva

Pós doutorando da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Data:30/05/2019

Aos meus pais Sandra Sales Bezerra e José Ailton Bezerra, minhas irmãs queridas, Samara Sales Bezerra e Solange Ferreira Bezerra pela a paciência, pelo o incentivo e pela a força. Parte fundamental dessa conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a realização desse sonho, pelo o que conquistei até agora, mas peço a ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

À minha mãe Sandra Sales Ferreira, ao meu pai José Ailton Bezerra e às minhas irmãs pelo amor incondicional e por serem meu arcabouço de sustentação que permitiu chegar nesse lugar. Obrigado pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas renúncias e por me darem a certeza de que eu poderei contar com vocês sempre, independentemente da circunstância.

À Profa. Dra. Marize Campos Valadares, pela orientação, pelos ensinamentos, pela a paciência e incentivo durante a elaboração do trabalho. A toda equipe do laboratório que eu faço parte que colaboraram de uma forma ou de outra com o meu crescimento pessoal e profissional diariamente: Hallisson Ranieri, Karén Gonçalves, Artur Christian, Renato Ivan, Ana Clara Stival, Bruna Tollstadius, Bruna Pedralli, Gessyca Gonçalves, Laís Brito, Lara Prado, Larissa Cleres, Jaqueline Penha, Thaisângela Rodrigues, Thaís Rosa, Tatiane e Wanessa Andrade. Entre outras pessoas do grupo FARMATEC que colaboraram com o trabalho: Professora Eliana, Danillo Fabrini M. C. Veloso P. e Ana Paula Bernades.

Agradeço a todos os professores que compõem o quadro de docentes do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que colaboraram de maneira direta ou indireta para o meu desenvolvimento como pesquisador. Agradeço aos arguidores da minha banca que se dispuseram a colaborar com o trabalho. Enfim, agradeço aos meus amigos que sempre estiveram comigo durante esse tempo.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

TABELAS

FIGURAS

SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAL: NANOCIÊNCIA, NANOTECNOLOGIA E NANOTOXICIDADE 2

1.1.1 Propriedades e aplicações dos nanotubos de carbono (NTC) 4

1.1.2 Propriedades e aplicações do dióxido de titânio (TiO2) 5

1.1.3 Propriedades e aplicações do fulereno (C60) 6

1.2 REGULAÇÃO, EXPOSIÇÃO E TOXICOLOGIA GERAL DE NMS 7

1.3 SENSIBILIZAÇÃO DA PELE – DERMATITE DE CONTATO ALÉRGICA 18

1.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUTOS QUÍMICOS DE INDUZIR SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA .. 22

1.4.1 Ensaio direto de reatividade do Peptídeo (DPRA) 25

1.4.2 Ativação de queratinocitos: KeratinoSens ™ e ARE-Nrf2 luciferase e LuSens 27

1.4.3 Teste de ativação da linha celular humana (h-CLAT), Teste de ativação da linha de células U937 (U-SENS ™), Ensaio de avaliação de Interleucina-8 (ensaio IL-8 Luc) 28

2 OBJETIVOS 31

3 MÉTODOS 32

3.1 REAGENTES ADQUIRIDOS 32

3.2 LINHAGEM CELULAR 32

3.3 DISPERSÃO DOS NANOMATERIAIS 33

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS 33

3.5 TESTE DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR 34

3.6 ENSAIO DIRETO DE REATIVIDADE DO PEPTÍDEO (MDPRA) ENSAIO BASEADO NA OECD 442C 34

3.7 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PELA A TÉCNICA U-SENS™ (OECD 442E) 36

3.7 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE NMS DE MODULAR CITOCINAS INFLAMATÓRIAS PELO MÉTODO CBA 37

4 RESULTADOS 39

4.1 DESCRIÇÃO DOS NANOMATERIAIS 39

4.2 INTERNALIZAÇÃO CELULAR 41

4.3 ANÁLISES DE SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA 42
5 DISCUSSÃO 45
6 CONCLUSÃO 52
6 REFERÊNCIAS 53

QUADROS

Titulo	Página
Quadro 1: Proporções definidas dos componentes da fase móvel (fase aquosa A e fase orgânica B) usada na análise cromatográfica das amostras para realização do ensaio de reatividade de proteínas	35

TABELAS

Titulo	Página
Tabela 1. Modelos usando camundongos para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas e fotoalérgicas na pele.	20
Tabela 2. Cisteína/lisina modelo de predição *in chemico* o ensaio direto de reatividade do peptideo adaptado para mDPRA.	36
Tabela 3. Porcentagem de depleção de peptídeos sintéticos após exposição a NMs.	42
Tabela 4. Proeficiência da técnica U-SENS^{TM} de acordo com OECD 442E.	42
Tabela 5. Resultado do ensaio de estimulação do marcador CD86 baseado na OECD 442E.	43

FIGURAS

Titulo	Página
Figura 1. Esquema de classificação dos NMs orgânicos e inorgânicos.	3
Figura 2. Estrutura do Nanotubo de carbono parede simples.	4
Figura 3. Estrutura bidimensional da molécula de C60 produzida no aplicativo ChemDraw Ultra 7.0.	6
Figura 4. Representação das vias de exposição e possíveis órgãos de prováveis translocação dos NMs.	10
Figura 5. Estrutura da pele demonstrando a epiderme, a derme e a hipoderme.	11
Figura 6. Representa as possíveis vias de entrada dos nanomateriais nas células.	13
Figura 7. Representação da fase de indução do processo de sensibilização.	20
Figura 8. Representação da fase de estabelecimento da reação imunológica.	21
Figura 9. Representação das técnicas utilizadas na avaliação de cada evento-chave da sensibilização dérmica.	24
Figura 10. Equação do índice de estimulação (IE) do marcador CD86.	37
Figura 11. Representa o diâmetro de cada de NTCPS (A1) TiO_2 (B1) e C60 (C1) isoladamente e o potencial zeta (NTCPS (A2) TiO_2 (B2) e C60 (C2) respectivamente.	40
Figura 12. Representa o ensaio de internalização celular realizado em células de fibroblastos 3T3/balb. As imagens A1, A2 e A3, representam os NMs isoladamente do C60, NTCPS e TiO2, respectivamente. Já as imagens B1, B2 e B3, mostram as células sem exposição. Nas imagens C1, C2 e C3, foi apresentado células expostas aos NMs C60, NTCPS e TiO2 respectivamente.	41
Figura 13. Produção de IL-8 pela linhagem U937 após 24 horas de exposição à NMs. Os resultados estão expressos com média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes, realizados em duplicata (* $p < 0,05$; **$p<0,01$; *** $p < 0,001$quando comparado ao controle negativo).	44

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, Sigla ou abreviatura	Significado
A549	*Cell Line human from human lung(carcinoma),*
AOP	*Adverse Outcome Pathway*
APC	*células apresentadoras de atingeno*
CBA	*Cytometric Bead Array*
CD	*células dendríticas*
CV70	*Concentração na qual a viabilidade celular é de 70%*
DCA	*Dermatite de contato alérgica*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	*Dimetilsulfóxido*
DPRA	*Ensaio de Direto Reatividade do Péptideo*
ECV304	*Human urinary bladder carcinoma*
ECVAM	*European Center of Validation of Alternative Methods*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FDA	*Food and Drug Administration*
GPMT	*Guinea Pig Maximization Test*
HaCaT	*Human imortal Keratinocyte Cell*
HEK293	*Human Embryonic Kidney 293 cells)*
IATA	*Integrated Approach on Testing and Assessment*
IFNs	*Interferons*
IS	*Index estimulation*
LLNA	*Ensaio local do linfonodo*
LLNA:BrdU-ELISA	*Ensaio de Linfonodo Local: BrdU-ELISA*
MTT	*Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio*
NIH	*National Institutes of Health*
NMs	*Nanomateriais*
NR8383	*Rat Macrophage Cell Line*
NTC	*Nanotubos de carbono*
NTCPM	*Nanotubos de carbono parede simples*
OECD	*Organization for Economic Co-operation and Development*
SI	*Sistema imunológico*
TB	*Teste Buehler*
TEPQ	*Tecido estratificado pavimentoso queratinizado*
TGF	*Fator de crescimento transformador*
TiO_2	*Dióxido de Titânio*
TNF-a	*Tumor Necrosis Factor – a*
TNF-a	*Tumor Necrosis Factor – a*
U937)	*Cell histiocytic lymphoma Human*
U-SENS™	*Teste de Ativação da Linhagem U937*
ROS	*Reactive oxygen species*
KEK	*Human Embryonic Kidney 293 cells*

RESUMO

Métodos inovadores aplicadas na avaliação de alergenicidade de nanomateriais

[1]Soraia, F. B. [1]Valadares, M. C.
[1]Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro - Tox In- Faculdade de Farmácia da UFG.

Introdução: O uso em excesso de nanomateriais (NMs) fulerenos (C60), dióxido de titânio (TiO_2) e nanotubos de carbono parede simples (NTCPS) em diversas áreas da indústria, resultou no aumento da exposição humana e ambiental, sendo necessária a preocupação com a avaliação da toxicidade desses NMs. Estudos comprovam que esses podem interagir em diferentes sistemas, incluindo o sistema imunológico, podendo provocar diversas alterações em nível celular e tecidual evidenciando a necessidade de avaliar o potencial alergênico desses NMs. **Objetivo:** Investigar o potencial alergênico de NMs (TiO_2, NTCPS e C60) por meio de métodos inovadores, livres de animais, com validação regulatória e/ou cientÍfica. **Metodologia:** A priori, realizou-se a dispersão dos NMs em meio para cultivo celular e meio aquoso onde as amostras foram preparadas em concentração inicial de 200 µg/mL para realização dos testes. Após a dispersão foi realizada a caracterização dos NMs por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Seguindo para os ensaios de internalização realizados com células de fibroblastos 3T3/balb por meio da técnica de microscopia de campo escuro. Para o esclarecimento do potencial de sensibilização da pele foi realizado a avaliação do primeiro evento-chave por meio do método mDPRA que avaliou o porcentual de depleção dos peptídeos cisteína e lisina quando em contato com os NMs. Partindo para a averiguação do terceiro evento-chave que demonstrou o índice de estimulação do marcador CD86 presentes em células dendriticas quando em contato com o produto alergênico por meio da técnica U-SENS™. Por ultimo, foi realizado a determinação da quantificação de citocinas inflamatórias. **Resultados:** NMs demonstraram homogeneidade quando avaliados o diâmetro e índice de polidispersão, permitindo a realização dos testes de alergenicidade e modulação de citocinas, com valores de polidispersão NTCPS (0,148), C60 (0,105) e TiO_2 (0,548). O mDPRA demonstrou o possível potencial alergênico dos NMs sendo estes categorizados dentro da classe de positivo moderado com o porcentual médio de depleção dentro do estabelecido pela a OECD. Os ensaios de internalização demonstraram que ocorreu internalização do NM nas células. Dados do ensaio U-SENS™ comprovaram aumento na expressão do marcador CD86 com IS > 150 para NTCPS, C60 e TiO_2. Com EC150 para NTCPS (189,48 µg / mL), C60 (91,72 µg / mL) e TiO2 (183,05 µg / mL). Os ensaios de quantificação de IL-8 demonstraram aumento significativo da citocinas para os NMs C60 e NTCPS. **Conclusão:** Os ensaios demonstram que as técnicas mDPRA e U-SENS ™ são capazes de avaliar o potencial alergênico de nanomateriais, contribuindo para o entendimento e compreensão dos efeitos desses NM quando em contato com o organismo humano.

Palavras-chave: Caracterização de nanomateriais, metodologias inovadoras, alergenicidade, quantificação de IL8.

Agradecimentos: ToxIn, CNPq, CAPES, FINEP

Innovative methods applied in the assessment of allergenicity of nanomaterials

[1]Soraia, F. B. G; [1]Valadares, M. C.
[1]Laboratory of Teaching and Research in Toxicology In Vitro - Tox In- Faculty of Pharmacy, UFG.

Introduction: The excessive use of fullerene (C60), titanium dioxide (TiO_2) and single-wall carbon nanotubes (SWCNTs) in several areas of the industry has resulted in increased human and environmental exposures, evidencing the need for the assessment of toxicological profile of these nanomaterials (NMs). Studies have shown that the interaction of these materials in different systems, including the immune system, may cause several alterations at the cellular and tissue level, demonstrating the need to assess the allergenic potential of these NMs. Nonetheless, few data are available regarding the applicability of *in vitro* evaluation platforms for NMs toxicity assessment. **Objective:** The aim of this study was to investigate the skin sensitization potential of NMs (TiO_2, SWCNTs and C60) through innovative animal-free methods with regulatory and/or scientific validation. **Methods:** after dispersion in aqueous solvent, the samples were characterized through the Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) techniques, while the internalization assays were carried out using the dark field microscopy technique (Cytoviva). For the assessment of skin sensitization potential, validated methodologies for regulatory/scientific purposes were used. The key-event 1 of skin sensitization adverse outcome pathway (AOP) (reactivity with skin peptides) was evaluated using the micro-Direct Peptide Reactivity Assay (micro-DPRA) technique and the key event 3 (dendritic cells activation) using the U-SENS^{TM} assay followed by cytokine quantification through the Cytometric Bead Array method by cytometer of flux. **Results:** NMs were well dispersed when sonicated allowing the evaluation of the allergenicity and modulation of cytokines tests. With the PDI values SWCNTs (0.148), C60 (0.105) e TiO_2 (0.548). The internalization assays demonstrated that NMs were internalized by fibroblasts, achieving the intracellular compartment. The mDPRA demonstrated that the NMs interacts potentially with skin peptides, demonstrating a significant percentage of depletion, characterizing these materials as moderate positive sensitizers according to the first key-event of sensitization. Data from the U-SENS^{TM} assay also demonstrated an increase in CD86 marker expression with Stimulation Index (SI) higher than 150 in a concentration-dependent manner, with EC150 for SWCNTs (189.48 µg/mL), C60 (91.72 µg/mL) and TiO2 (183.05 µg/mL). Additionally, cytokine quantitation assays demonstrated a significant production increase of IL-8 by U937 monocytic cell line exposed to NMs, which is a known biomarker of dendritic cell activation. **Conclusion:** The results demonstrated that micro-DPRA and U-SENS^{TM} methods are applicable for skin sensitization potential assessment of nanomaterials. Furthermore, the evaluated materials presented a positive profile for skin sensitization regarding the first and the third key-event of the Adverse Outcome Pathway of allergenicity.

Key-words: Characterization of nanomaterials, innovative methodologies, allergenicity, IL8 quantification.

Acknowledgement: ToxIn, CNPq, CAPES, FINEP

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização de nanociência, nanotecnologia e nanotoxicidade:

A definição do termo nanomaterial (NM) ainda não é bem estabelecida. Porém já se sabe que a origem do prefixo 'nano-' vem do grego *vávo* (anão). No campo cientifico, o termo significa, uma medida de 10^{-9} unidades. Na tentativa de definir o termo a Comissão Europeia, emitiu uma recomendação sobre a definição de nanomaterial. A mesma conceituava esses produtos como qualquer material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, cuja sua distribuição seja de 50% ou mais em dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 a 100 nanômetros (ECVAM, 2011).

Esses materiais são conhecidos pela a grande aplicação em diversos campos das ciências, devido serem dotados de propriedades especificas que possibilitam o desenvolvimento de dispositivos principalmente na área da biomedicina e da biotecnologia (GUIDANCE, 2011). A nanociência é responsável por processos de manipulação e engenharia de matéria em escala manométrica, considerando as propriedades elétricas, ópticas, térmicas e mecânicas desses NMs que são determinadas de acordo com o agrupamento de moléculas e átomos, diferenciando-os dos materiais em maior escala (TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013).

A nanociência também engloba o ramo da nanotecnologia que abrange a produção, caracterização e aplicação de novos componentes nanométricos em produtos úteis (dispositivos e sistemas), fornecendo a possibilidade de aprimorar produtos já existentes ou permitindo a criação de novos produtos sob medida e com propriedades químicas, físicas e biológicas determinantes, considerando a sua forma e tamanho em nanoescala. Esses produtos beneficiam diversos setores, o alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, médico-hospitalar, agrícola e na produção de cosméticos (TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013).

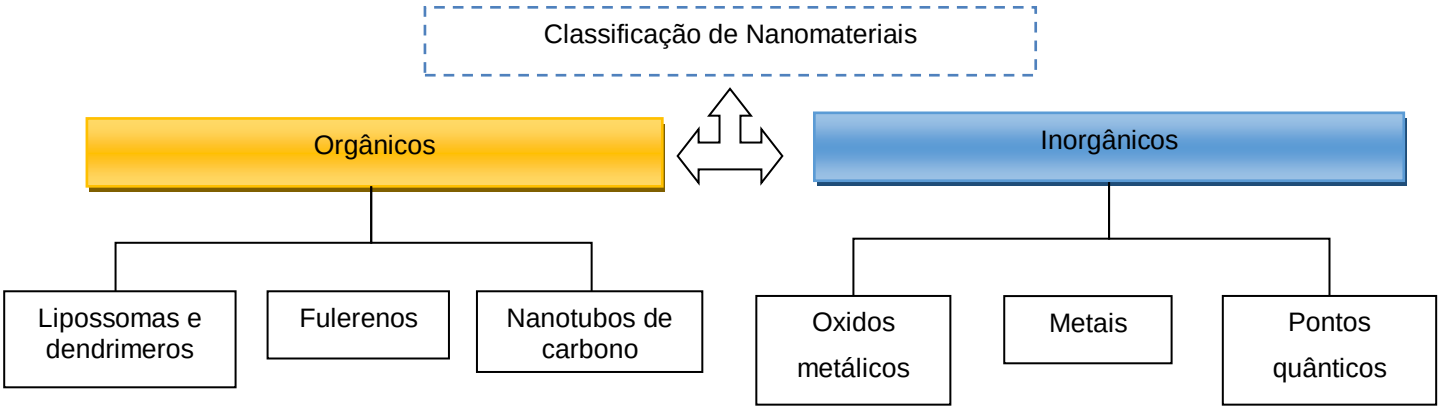
Indubitavelmente, a nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve, atualmente, com altos investimentos em pesquisa, sendo que os maiores investidores são os Estados Unidos, Alemanha e Japão, enquanto que o Brasil integra um grupo abaixo, no qual se encontram China e Índia. O crescente investimento nesse ramo

da ciência impulsiona o mercado mundial e potencializa o consumo de materiais, produtos e processos voltados para esta área (NOLASCO, 2016).

Atualmente, existem variedades de NMs, sendo que essas nanoestruturas podem apresentar diferentes tamanhos e formas. No geral, esses NMs são classificados em dois grupos, materiais **orgânicos ou inorgânicos**, porém, é possível ter uma nanopartícula híbrida inorgânico-orgânica. Podendo ser produzidos a partir de materiais, como, carbono, metais, óxidos sulfetos, entre outros (AILTKEN, et al., 2006; KREYLING; SEMMLER-BEHNKE; CHAUDHRY, 2010; GUIDANCE, 2011). As nanopartículas orgânicas, na maioria das vezes são compostas por carbono e hidrogênio, formando hidrocarbonetos, diferentes das nanopartículas inorgânicas que não contém átomos de carbono. Os NMs orgânicos incluem em seu grupo carbonos, nanocarreadores poliméricos e baseados em lipídios. Diferentemente das nanopartículas inorgânicas incluem nanopartículas metálicas / plasmônicas, magnéticas, semicondutoras e baseadas em sílica.

No grupo dos materiais orgânicos destacam-se nanoestruturas como os nanotubos de carbono e o fulereno que serão enfatizados neste trabalho. Outro NM que será avaliado é o dióxido de titânio, incluído dentro do subgrupo dos óxidos metálicos que abrangem o grupo de materiais inorgânicos. O esquema abaixo, baseado no trabalho de Glauciene Marcone (2017), demonstra a classificação dos NMs.

Figura 1. Esquema de classificação dos NMs orgânicos e inorgânicos.



Fonte: próprio autor.

Dessa forma, NMs são categorizados de acordo com seu tamanho, composição, forma e origem (JEEVANANDAM, 2018) e se destacam nos avanços tecnológicos devido às suas características físico-químicas específicas que lhes conferem

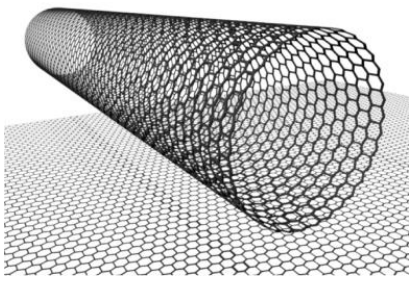
caraterísticas ópticas, magnéticas, catalíticas mecânicas, elétricas, termodinâmicas e eletroquímicas, únicas e vantajosas para aplicações industriais e biomédicas (CUIDANCE, 2011) podendo sofrer mudanças de acordo com o tamanho. Além do diâmetro, existem outras variáveis que podem influenciar diretamente nas propriedades desses NMs, como por exemplo a composição química e a forma de uma nanopartícula (SEMMLER-BEHNKE; CHAUDHRY, 2010).

Com isso, é fundamental conhecer as características dessas nanoestruturas bem como sua aplicabilidade em escala industrial, para então avaliar as vias de exposição e os riscos decorrentes do contato direto com os seres vivos. De acordo com Powers e colaboradores (2006) para entender apropriadamente os mecanismos e efeitos tóxicos de materiais em nanoescala é necessário compreender as propriedades e características desses NMs tanto fora quanto dentro do ambiente biológico (POWERS et al., 2006). Existe um consenso crescente de que a caracterização completa e precisa das nanopartículas é uma parte essencial da avaliação do potencial de toxicidade em sistemas biológicos (FOSS HANSEN, Steffen et al., 2007; CARD; MAGNUSON, 2010).

1.1.1. Propriedades e aplicações dos nanotubos de carbono (NTC)

O NTC é uma nanoestrutura de forma cilíndrica com uma ou mais camadas de grafeno que se diferenciam em dois subgrupos, os nanotubos de parede simples (NTCPS), compostos apenas por uma folha de grafite (Figura 2). E os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) que inclui várias folhas de grafite concêntricas na sua composição. São formados por folhas de grafite coaxial enroladas em cilindros com extremidade fechada e uns arranjos hexagonais de átomos de carbono com hibridização, similares àqueles que formam a grafite (FERREIRA; RANGEL, 2009) com diâmetro de 5 a 20 nm embora os diâmetros possam exceder 100 nm (De VOLDER., 2013).

Figura 2. Estrutura dos Nanotubos de carbono parede simples.



Fonte: Ferreira, Hadma, 2009

Este NM apresenta características exclusivas que geram inúmeras investigações para possíveis aplicações, como, resistência à tração, alta estabilidade química e térmica, alta elasticidade, podendo exibir condutividade metálica (GOODING, 2005) sensora, e de armazenamento de energia (TROJANOWICZ, 2006) sendo os NTCPS, excelentes semicondutores (DING et al., 2009). A propriedade eletrica e óptica de NTCPS dependem sensivelmente da estrutura do tubo (SAITO; DRESSELHAUS G.; DRESSELHAUS M., 1998).

Dentre as inúmeras aplicações desse composto, estão as biológicas, tais como diagnóstico de doenças e liberação controlada de fármacos (do inglês: “Drug Delivery”) (CHERUKURI et al., 2004). Ambos os tipos de nanotubos de carbono podem ser usados em potencial para fabricação de dispositivos eletrônicos e terapias biomédicas. A capacidade de absorver a luz infravermelha, gerar calor, peso leve e estabilidade química encorajaram os cientistas a investigá-lo como uma ferramenta de diversas terapias, inclusive para o câncer (MADANI; MANDEL; SEIFALIAN, 2013).

1.1.2 Propriedades e aplicações do dióxido de titânio (TiO2)

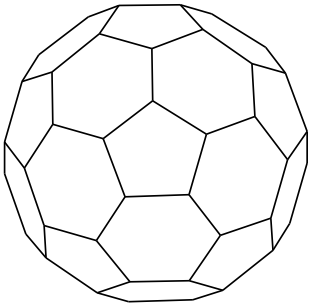
O TiO_2 é um NM de estrutura amorfa, considerado multiusual, principalmente por causa da sua função de fotocatalizador (OHTANI; OGAWA; NISHIMOTO, 1997). Além de fotocatalizador, possuem propriedades fotocatalíticas únicas, excelente biocompatibilidade, alta estabilidade química e baixa toxicidade. Este NM tem motivado interesse em escala industrial, intensificando os estudos experimentais e teóricos para aplicações biomédicas (YIN et al.,2013).

O composto também é utilizado na terapia fotodinâmica para tratamento de câncer, obtenção de imagens no diagnóstico de doenças, biossensores para ensaio biológico e engenharia genética (CHEN; SELLONI; CHEN, 2014). Além disso, é utilizado também na produção de protetores solares, células fotovoltaicas, e inclui, uma série de aplicações ambientais e biomédicas, tais como degradação fotocatalítica de poluentes, purificação da água, biossensibilização e entrega de fármacos (CHEN; SELLONI; CHEN, 2014), na fabricação de próteses dentárias, maquiagens, creme dental branco, pintura opaca, produção de tintas, vidros, dispositivos eletrônicos e aditivos alimentares, na indústria automotiva, com a função de remover emissões prejudiciais de gases de escape e em usinas de energia para remover óxidos nitrosos (CHARLES et al., 2016).

1.1.3 Propriedades e aplicações do fulereno (C60)

Os C60 são uma forma de carbono, composto por estrutura com arranjo esférico, elipsoide ou cilíndrica, com dezenas de átomos de carbono. Consistem em folhas de anéis de carbono hexagonais, pentagonais ou heptagonais permitindo a formação de estruturas tridimensionais. A menor estrutura descoberta é o carbono 60 (Figura 3) conhecido como *buckminsterfullerene* e às vezes chamado de *buckyballs* (HUCZKO; BYSZEWSKI, 1998).

Figura 3. Estrutura bidimensional da molécula de C60 produzida no aplicativo ChemDraw Ultra 7.0.



Fonte: próprio autor.

Suas propriedades moleculares diversas permitem atuar com função de semicondutor, condutor e supercondutor sob condições específicas. Possui efeito fotocrômico, que é uma mudança na transmissão de luz com base na intensidade, capacidade de reter outras substâncias no interior da molécula, de absorver os radicais livres, entalpias de decomposição, transporte de carga, propriedades termodinâmicas e a desordem molecular (YADAV, 2018; MACOVEZ, 2018).

A estrutura única de gaiola de carbono do C60 oferece inúmeras oportunidades de funcionalização, dando ao NM grande potencial para aplicações no campo da medicina (MATIJA et al., 2013). Pode ser adicionado à estrutura à capacidade de atração de elétrons e numerosos compostos funcionais com propriedades amplamente diferentes (LIU et al., 2014), estendendo suas aplicações para áreas diferentes da ciência, especialmente aquelas relacionadas à engenharia biomédica incluindo terapia de câncer, terapia fotodinâmica, utilizados para estudos antivirais e antibacteriano para futura aplicação no tratamento dessas infecções, para a produção de biossensor, produtos antioxidante, entrega de fármacos, entre outros (GOODARZI et al., 2017).

Com o uso abrangente desses NMs a base de carbono e óxido, surgiu em paralelo a preocupação devido à nanotoxicidade decorrente a exposição desses produtos,

descartados em diferentes ambientes, sejam naturais, urbanos ou industriais, sem o devido controle e regulamentação (CHORTAREA et al., 2018). A atenção e cautela em relação a exposição desses produtos é pertinente, visto que, a uma crescente produção industrial o que aumenta o risco de exposição, devido o elevado contato da área superficial desses produtos com o ser humano devido à alta reatividade química. Além disso, a enorme diversidade composicional e estrutural possibilita o maior contato com os trabalhadores responsáveis pela a sínteses, preparações, modificações finais desses produtos.

Existem poucas informações e dados toxicológicos relacionados a esses produtos. Esse déficit, está relacionado com a ausência de ensaios validados disponíveis para avaliar nanotoxicidade, necessitando de novas metodologias ou ensaios adaptados (PIPERIGKOU et al., 2016). A maioria dos estudos existentes avaliam apenas citotoxicidade, ou eventos isolados relacionados a toxicidade. Essa escassez de informação é nítida, principalmente quando se avalia o end point de sensibilização dérmica. Necessitando de adaptar ensaios já existentes para a avaliação desses produtos.

1.2 Regulação, exposição e toxicologia geral de NMs

Conforme descrito no documento da União Europeia para registro de novos produtos e/ou produtos produzidos em alta escala o Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (do inglês: REACH- *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) toda substância química fabricada, incluindo os NMs, devem ser avaliados quanto o seu potencial tóxico e o risco de exposição (DONCHEVSKAYA, 2009). Sendo assim, o regulamento, visa melhorar a proteção da saúde humana e do ambiente frente aos riscos decorrentes de produtos químicos e, simultaneamente, fomentar a competitividade da indústria química (HARTMANN et al., 2017).

O REACH promove a utilização de métodos alternativos à experimentação animal para a avaliação de toxicidade de substâncias e NMs, tendo em vista a redução do número de ensaios em animais e uma ciência de qualidade. Em princípio, o Regulamento aplica-se a todas as substâncias químicas, não apenas as usadas em processos industriais, mas também, as que compõem produtos acabados, que fazem parte do cotidiano, como, por exemplo, as contidas em produtos de limpeza e tintas, em artigos

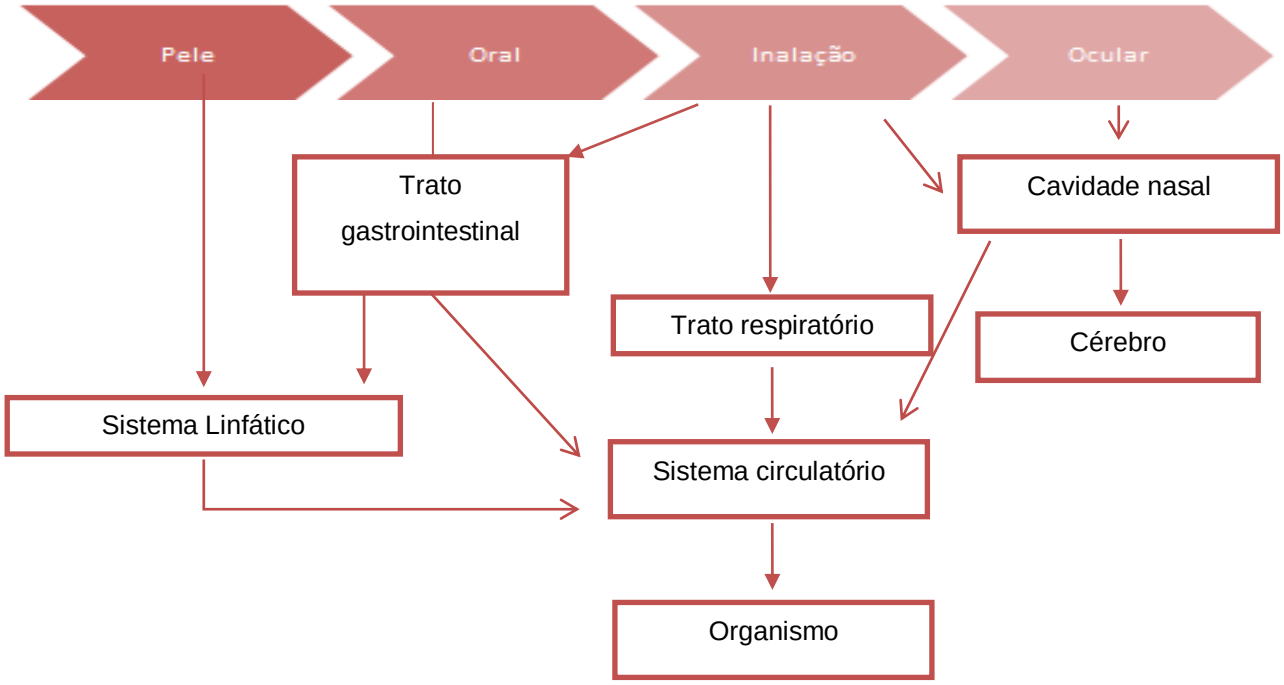
como o vestuário, o mobiliário e os aparelhos elétricos (RAUSCHER; RASMUSSEN; SOKULL-KLUTTGEN., 2017). O documento tem impacto, não somente na maioria das empresas da União Europeia, mas também no mundo (HARTMANN et al., 2017).

O aumento significativo da produção de novas substâncias, e o crescimento de ciências como a nanotecnologia e nanociência, provoca uma eminente preocupação com os efeitos biológicos, em especial a toxicidade desses NMs. Mesmo sendo compostos com propriedades bem conhecidas, podem representar um perigo quando projetados em tamanho manométrico (NHI., 2016). Pipegkou e colaboradores (2016) evidenciaram a preocupação com os NMs. Segundo os autores, quando em contato direto com o ser humano e o meio ambiente, esses produtos podem resultar em efeitos tóxicos, havendo assim, a necessidade de estudos obrigatórios no campo da nanotoxicologia.

Estudos, têm evidenciado que a toxicidade desses NMs é devida, suas características de superfície, reatividade (MOTOHIRO et al., 2011) biopersistência e alta similaridade a tipos específicos de fibras de amianto micronizadas, que já são conhecidas por sua alta toxicidade (CHORTAREA et al., 2018).

Em relação às principais vias de exposição humana dos NMs, Pallardy e colaboradores (2017) ressaltam ser por contato dérmico e inalação. Além disso, estudos atribuem que 5 sistemas diferentes e órgãos, como, a pele, o sistema tratogastrointestinal, o sistema respiratório, a cavidade nasal e os olhos podem ser afetados pelos os mesmos. O esquema abaixo (figura 4) demonstra os caminhos mais prováveis de redistribuição ou migração, desses produtos e quais possíveis órgãos, a serem atingidos **(**KAGAN et al., 2010; YOKEL; MACPHAIL, 2011).

Figura 4. Representação das vias de exposição e possíveis órgãos de prováveis translocação dos NMs.

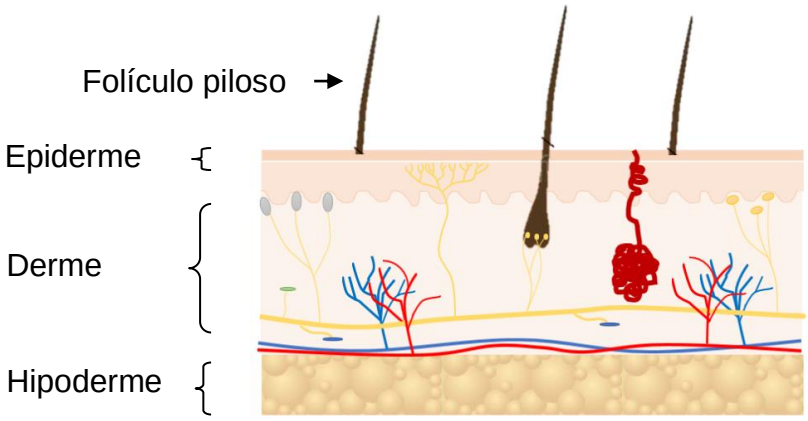


Fonte: Adaptado de KAGAN et al. (2010); YOKEL; MACPHAIL, (2011)

De acordo com Ema e colaboradores (2011), durante o processo de fabricação, uso e descarte de NMs. A pele e os olhos são os órgãos de maior risco de exposição (EMA et al., 2011) provavelmente, por estarem em contato direto com o ambiente externo. Porém, uma pergunta frequente entre os pesquisadores, é se realmente NMs são capazes de ultrapassar a camada da pele e serem absorvidos através do estrato córneo (Figura 4) se acumulando nos tecidos dérmicos. A literatura demonstra que há poucas informações disponíveis sobre a entrada desses materiais pela epiderme. Sendo um caminho longo a percorrer.

A figura 5, esclarece a composição da pele, sendo que essa estrutura é composta por três camadas diferentes, a epiderme, a derme e a hipoderme, respectivamente. Essas camadas possuem células especializadas que são importantes para a compreensão das respostas imunológicas e da ação dos nanomateriais no organismo (PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT, 2017).

Figura 5. Estrutura da pele demonstrando a epiderme, a derme e a hipoderme.



Fonte: próprio autor.

A permeação de NMs por via dérmica é considerada extremamente baixa em condições normais. Porém, a pele é o órgão mais propenso a sofrer constantes danos mecânicos e irritações, provocadas diariamente por produtos químicos e diferentes materiais. Quando a função da barreira da pele é rompida, NMs diversos podem passar pelos tecidos da pele, e consequentemente, penetrar as camadas mais profundas como a hipoderme, causando efeitos imunomoduladores, tais como ativação de células e citocinas inflamatórias (YOSHIOKA et al., 2017; JATANA; DELOUISE, 2014).

Os folículos pilosos (Figura 5) são estruturas presentes na pele e funcionam como reservatórios eficientes de longo prazo, adequados para o acúmulo de NMs. Embora permaneça desconhecido se esses NMs podem realmente penetrar na pele através dos folículos pilosos. A via folicular pode ser uma das vias de penetração dos NMs (PATZELT et al.,2011; YOSHIOKA et al., 2017).

Segundo Sapna Jain e colaboradores (2012) a captação desses materiais ocorre pelos poros da pele, cruzando a primeira camada de proteção (estrato córneo) e se localizando ao redor da raiz dos folículos pilosos. Alguns fatores podem influenciar na interação desses produtos com o sistema imunitário, entre eles, estão as características físico-químicas dos NMs (KUHN et al., 2014) e o estado de barreira da pele. Ou seja, a condição de saudável ou doente da epiderme (YOSHIOKA et al., 2017).

Quando os NMs conseguem atravessar a camada da pele, células do sistema imunológico são responsáveis pelo conhecimento, captação, processamento e liberação de NMs no organismo. Entre essas células estão os macrófagos, que podem captar essas nanopartículas e transporta-las pelo sistema imune (GUSTAFSON et al., 2015).

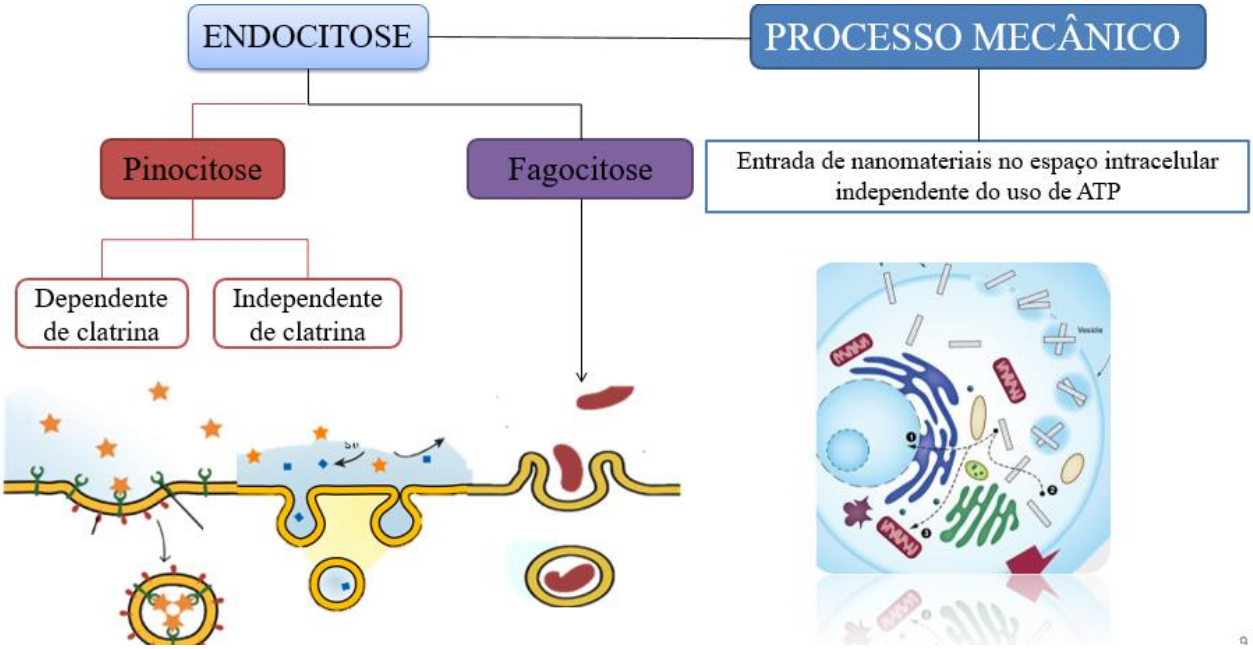
NMs são captados por células por meio de diversas vias, podendo ser por vias endocíticas, mediadas por clatrina, vias cavéolas, vias receptoras depuradoras ou processos de fagocitose e macropinocitose (KUHN et al. 2014; PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT, 2017) e por processo mecânico passivo, sem gasto de energia (BIANCO; KOSTARELOS; PRATO, 2005; YANG, 2007; JAIN, 2012). Esses processos de internalização são profundamente dependentes das propriedades dos NMs, como tamanho, forma, revestimento superficial e ambiente celular (PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT., 2017). Habraken e colaboradores (2016) demonstrou que o tamanho da nanopartícula e o tipo de célula envolvida no processo de absorção são críticos na determinação da via que será utilizada.

A via de endocitose mediada por clatrina é conhecida por incluir o processo de pinocitose, uma forma de endocitose mediada por receptor. Essa via abundante, é essencial para a absorção de muitas moléculas, como a lipoproteína de baixa densidade e a transferrina (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; KUHN et al., 2014). Quando a endocitose mediada por clatrina é iniciada, os chamados “buracos revestidos” entram em ação consistindo de receptores transmembranar e proteínas citosólicas, como a clatrina e o complexo proteico adaptador - AP2 (CONNER; SCHMID, 2003; KUHN et al., 2014).

Na endocitose, os NMs são envolvidos nas primeiras vesículas endocíticas e, portanto, não são diretamente transportados para o citosol. Em contraste, os NMs internalizados através *da* penetração da membrana são diretamente transferidos para o citoplasma, o que pode ser a melhor escolha, particularmente para a liberação direcionada as moléculas ativas (WANG et al., 2012).

Outro processo que pode estar envolvido na entrada de NTCs em células é um processo mecânico que ocorre quando esses NMs se difundem na membrana da célula, como uma agulha perfurando a célula, passando do meio extracelular para o meio intracelular independente do uso de ATP (BIANCO; KOSTARELOS; PRATO, 2005; YANG, 2007; JAIN, 2012). A presença desses produtos dentro do organismo, podem causar diversos efeitos tóxicos nos seres humanos, prejudicando diversos orgãos e causando efeitos no sistema imunológico, possivelmente alergias.

Figura 6. Representa as possíveis vias de entrada dos nanomateriais nas células.



Fonte: FCHO et al., 2011; BIANCO; KOSTARELOS; PRATO, 2005; YANG, 2007; JAIN, 2012.

Estudos *in vitro* em diversas linhagens celulares, e ensaios em animais demonstraram efeitos tóxicos controversos dos NMs (LUANPITPONG; WANG; SHI KAM et al., 2004). Ao avaliar citotoxicidade de NTC *in vitro.* Por meio da exposição de células de macrófagos humanos alveolar através do teste de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tretazolium] foi possível comprovar que houve citotoxicidade (JIA, 2005). Já quando avaliado pelo teste de WST-1 em diversas células pulmonares A549 (do inglês: *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells),* ECV 304 (do Inglês: *Human urinary bladder carcinoma)* e NR8383 (do inglês: *rat alveolar* cell line) não houve citotoxicidade comprovada.

NTCPS a base de Ni, Fe provocaram em células de Rim Humana Embrionária (HEK293) (*do inglês: Human Embryonic Kidney 293 cells)* em diferentes concentrações (0.78-200 µg / mL) a inibição da fase G1. Processo que ocorre na etapa de interfase da divisão celular. Além disso, houve morte celular por apoptose e diminuição da capacidade adesiva das células. As HEK293 também exibiram respostas ativas a NTCPS, tais como a secreção de algumas proteínas de 20-30 kD para revestir os NTCPS, agregação de células nos NTCPS e a formação de estruturas nodulares (CUI, et al. 2005).

Um estudo *in vitro* avaliou estresse oxidativo de NTCs e deduziu que esses NMs causaram a indução de oxidantes e enzimas tóxicas. Sabe-se que um nível mais

elevado de estresse oxidativo pode levar ao processo de inflamação (JAIN; SINGH; PILLAI, 2012). Sendo um parâmetro importante ao se avaliar sensibilização dérmica.

NTCPS também induziram a secreção de quimiocinas por macrófagos, não sendo necessária a captação celular para que houvesse sinalização de quimiocinas por essas células. Este estudo indica que células imunes são capazes de "detectar" NTCPS através de receptores imunes específicos, sendo relevantes para o estudo do impacto destes materiais na saúde humana (MUKHERJEE et al, 2018).

Em relação a genotoxicidade, capacidade de agentes químicos de danificar a informação genética no interior de uma célula, causando mutações e induzindo modificações na sequência dos nucleotídeos e modificações na estrutura em dupla hélice do DNA de um organismo vivo (COSTA-AMARAL, et al., 2019). Foi investigado o efeito deletério das nanopartículas de NTCPS no material genético de células V79 (do inglês*: Cellosaurus cell line V79*). Resultados derivados do ensaio de micronúcleos indicaram dano cromossômico. Já, o ensaio cometa, demonstrou um aumento no dano ao DNA após 3 horas de exposição ao NM. Concluiu-se que NTCs têm a afinidade de interagir com o DNA, tornando-os potencialmente mutagênicos ou carcinogênicos (DOAK et al., 2012).

Devido à sua natureza coesiva, os NTCs tendem a formar agregados estáveis dentro dos organismos vivos, causando estresse inflamatório e oxidativo nos locais de sua deposição. Estes efeitos, ao longo do tempo, podem levar à destruição de tecido e órgãos e aumentam o risco de câncer (JAIN; SINGH; PILLAI, 2012). NTCs também demonstrou que podem modular a produção de citocinas de perfil Th2 de maneira significativa, (DI, M. Gioacchino et al., 2011) envolvidas na resposta inflamatória, e citocinas tipo 2, presentes nos pulmões (DONG; MA., 2018).

Sobre o efeito biológico NTCPS no desenvolvimento embrionário de espécies peixe-zebra, foi possível revelar, que houve a inibição significativa do desenvolvimento embrionário, na concentração de 120 mg/L. Houve atraso na eclosão, que ocorreu provavelmente pela a indução de catalisadores Cobalto e Níquel utilizados na produção de NTCPS, que ao longo do ensaio, permaneceram em concentrações vestigiais após a purificação, sugerindo que materiais associados com NTCPS brutos (talvez contaminantes de metal) têm o potencial de afetar a vida aquática quando liberados neste ambiente (CHENG J., FLAHAUT;CHENG E., 2007).

A maioria dos estudos descritos na literatura envolve a toxicidade pulmonar *in vivo.* NTCs purificados, em doses diversas (0,1 mg / 30 mg e 3,3 mg / kg),

apresentaram grandes agregados de partículas em macrófagos no espaço alveolar. Alguns desses agregados também foram encontrados no interstício, formando granulomas em dose-dependente (0.1-0.5 mg). Foi demonstrada a mortalidade (5/9) nos animais tratados com alta dose de NTC, sugerindo que qualquer uso intratraqueal e estudos com NTC não devem envolver doses muito altas. Os NTCs contêm substâncias de níquel e ítrio em sua composição. O níquel e seus compostos são altamente tóxicos (LAM, 2004). Demonstrando uma relação com a ativação da resposta imunológica. Ou potencializando a sensibilidade, induzindo inflamação em animais com deficiência de vitamina na concentração 0,40 µg. Em controversa, estudos realizados por Yang (2008) demonstraram que a acumulação NTCPS nos pulmões de ratos, causou baixa inflamação, ausência de mudança nos indicadores imunológicos, resultando em uma baixa toxicidade em diferentes concentrações (40µg-1000µg).

Estudos *in vivo* demonstraram a presença de neutrófilos pulmonares em concentrações de 10-40 µg/mL. Além disso, foi possível observar manchas de infiltração celular e edemas nas vias aéreas e no interstício quando expostos a concentrações maiores (TONG, 2009). Também foi possível verificar a presença de granulomas, (WARHEIT ET AL., 2004; POLAND et al., 2008). O NM, também suprimiu a resposta das células T em cobaias, o que foi associado aos efeitos diretos em células dendríticas (TKACH et al., 2011). Uma vez que essas células, são responsáveis por apresentar alvos estranhos aos linfócitos T por meio da migração aos linfonodos locais. Neste estudo, não foi detectado potencial de induzir sensibilização da pele, apenas irritação ocular. Cabe enfatizar que a capacidade preditiva deste ensaio não é a melhor maneira de avaliar atualmente sensibilização da pele, sendo, que hoje, há testes mais eficazes e que abrangem o refinamento e reduz os números de animais, eliminando mais variáveis e se mostrando mais precisos em relação a utilização de cobaias, um exemplo, é o ensaio do linfonodo local – LLNA.

Estudos sobre sensibilização dérmica de TiO_2 também são escassos e inconclusivos. Porém, estudos de citotoxicidade e ativação de células do sistema imune disponíveis na literatura, são ferramentas importantes para facilitar a compreensão dos efeitos biológicos dos NMs e possivelmente, ajudar a esclarecer a capacidade desses produtos de causar dermatite de contato alérgica.

Ao avaliar *in vitro* o efeito de TiO_2 após exposição de células dendríticas, foi possível demonstrar que essas células, são capazes de capturar nanopartículas de TiO_2 eficientemente (MANOVOLA et al., 2008). Neste contexto TiO_2 também provocou a

secreção de IL-1β por macrófagos isolados a partir de camundongos portadores de uma mutação no nucleotídeo (NOD2) (RIEDLE et al., 2017). Curiosamente, um estudo *in vitro* demonstrou que células dendríticas humana após o contato com TiO_2 produziram espécies reativas de oxigênio (ROS) (do inglês *Reactive oxygen species*) promovendo a maturação das células e liberação de citocinas pró-inflamatórias (SCHANEN et al., 2013).

NM de TiO_2 demonstraram aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras relacionadas à ativação de células dendriticas CD86, CD80, MHC-II e TNF-α sendo que a estimulação dessas moléculas tem papel fundamental na avaliação da dermatite de contato alérgica (ZHU et al.,2014). Além disso, esses NMs ocasionaram ativação do inflamassoma NLRP3 em células THP-1, células correlacionadas com a indução de inflamação pulmonar *in vivo* resultando na expressão do receptor de IL-1 (YAZDI et al., 2010). A passagem de NMs para os gânglios linfáticos de drenagem parecem ser dependentes do tamanho uma vez que um estudo relata apenas partículas de 20-200 nm são capazes de drenar livremente para os gânglios linfáticos (MANOLOVA et al., 2008).

A exposição *in vivo* de TiO_2 em nanoescala produziu efeitos transitórios, como inflamação e lesão celular no período de 24 h. Os mesmos danos foram causados nos pulmões quando expostos a mesmo produto (WARHEIT, et al.,2006). Exposição ao TiO_2 desencadeou, em teste com camundongos BALB / c após exposição tópica, uma resposta pró-inflamatória TH1 indução de células dendriticas e uma resposta na produção de citocina IL-2 e IFN, tendo efeito imunoestimulador modesto em células T. Foi capaz de induzir aumento na população de linfócitos quando comparados aos controles não tratados (SCHANEN et al., 2013).

Ao realizar a exposição oral de NM TiO_2 um estudo de 28 semanas demonstrou após a exposição (64 mg/dia) de nanopartículas de diâmetros distintos (18 e 120nm), a presença de achados histopatológicos, deformidades no tecido do fígado, atrofia glomerular nos rins, hialinização de ilhotas do pâncreas, foram induzidas por partículas de diâmetro menores (18 nm) porém, não ocorreu o mesmo após a exposição a partículas maiores (120 nm) resultando na falta de retenção sistêmica das mesmas (GU et al., 2015).

Ao realizar a exposição oral de NM TiO_2 em camundongos C57BL / 6 por via intranasal em dose única, no 4° dia pós-natal (P4) e em três doses, nos dias pós-natais 4, 7 e 10 (cada dose = 1 µg / g peso corporal). Foi possível concluir após a avaliação realizada no 14° dia que uma única dose de nanopartículas de TiO_2, desencadeou um

influxo de células inflamatórias, e doses múltiplas, levou ao aumento da inflamação, inibição do desenvolvimento pulmonar, infiltrado polimorfonuclear e modulação de citocinas múltiplas, comprovando a ativação da resposta imunológica. Além disso, células de macrófagos mostraram capturarem eficientemente as nanopartículas de TiO_2, (AMBALAVANAN et al., 2012).

Em relação à citotoxicidade de C60 *in vitro*, o estudo de Rancan (2002) avaliou citotoxicidade do NM e concluiu que quando em contato com células de linfócitos T humano, C60 provocou inibição do crescimento de células dendríticas, quando usado na concentração de 50 µM. Já células KEK, quando expostas a diferentes concentrações (0,004 a 0,4 mg/mL), sofreram diminuição significativa na viabilidade em comparação ao controle de células, havendo também aumento na expressão de interleucina (IL) 8 após 48 h de exposição (ROUSE et a.,2006).

Em controvérsia aos resultados dos estudos anteriores, um trabalho relatou sobre a citotoxicidade de C60 em diferentes concentrações (0-226 µg/mL),. Após a exposição de células de macrófagos alveolar, concluiu-se que não haver citotoxicidade significativa (JIA, 2005). Fioroto e colaboradores (2006) demonstram resultados semelhantes em células macrofágicas de linhagem J774 em concentrações de 15-60 µg /mL. Acrescentando que a captação celular C60 pelas células macrofágicas foi baixa e que a citotoxicidade desse produto, foi menor que o grafite.

Quando avaliado de acordo com seu potencial para genotoxidade*,* C60 provocou a indução de danos no DNA, medidos pelo ensaio de cometa. Além disso, agregados de C60 no DNA provocaram mutações de substituição e transversão nos pares de bases do material genético onde as substituições eram dominantes, sendo mais de 60% nas bases G:C (TOTSUKA, 2009).

A literatura relata vários ensaios envolvendo o sistema respiratório em ratos após a exposição de aerossóis de C60 em diferentes tamanhos (55 nm, 0,93 µm) por 10 dias consecutivos. Após o lavado broncoalveolar de ambos os grupos de exposição, foi possível observar pigmentos marrons de C60. A deposição pulmonar do C60 foi maior em ratos expostos a nanopartículas do que em animais expostos a micropartículas. Porém, o estudo não encontrou alterações significativas nos parâmetros toxicológicos avaliados, necessitando de avaliações adicionais, envolvendo exposições por inalação mais longa, para melhor conclusão sobre o potencial de toxicidade, seja na forma de nanopartículas ou micropartículas (BAKER, 2008).

Avaliando o parâmetro de ecotoxicidade foi possível concluir que C60, quando expostos a embriões e larvas de “Zebra fish”, na concentração de 1,5 mg / mL, não ocasionou morte celular, porém, ocorreu atraso no desenvolvimento de embriões (ZHU, 2007). Já, C60 hidroxilados provocaram anormalidades no desenvolvimento embrionário e aumento da mortalidade de peixe-zebra e cabeçuda em concentrações de 2,5 µg / mL e 10 mg/mL, respectivamente (USENKO et al., 2007).

Quando avaliados quanto a capacidade de induzir sensibilização dérmica, irritação dérmica e fotossensibilização, os dados encontrados surgerem uma melhor avaliação devido os diferentes tipos de C60 e os poucos estudos realizados. Um estudo com C60 altamente purificados (HPFs) relatou que quando testados em animais de laboratório o NM não induziu irritação cutânea primária ou cumulativa, sensibilização cutânea, fotossensibilização cutânea ou fototoxicidade de contato (AOSHIMA, 2009).

Existem evidências de que as propriedades físico-químicas específicas de NMs podem potencializar ou iniciar respostas imunes alérgicas. Já se tem esclarecido que esses produtos podem induzir mecanismos celulares, já elucidados e promoverem doenças alérgicas (SHANNAHAN; BROWN, 2014). Estudos *in vitro* e *ex vivo* comprovam que as interações desses NMs com o sistema imune podem potencializar reações como imunossupressão, secreção de interleucinas e alterações em células imunológicas (PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT., 2017).

Materiais nanométricos também podem afetar a polarização e a reprogramação de macrófagos, dependendo principalmente da sua composição físico-química (HOPPSTÄDTER, 2015). Foi demonstrado que células com fenótipos pró-inflamatórios M1 ou anti-inflamatórios M2 exibem uma capacidade de captação distinta para esses NMs (MIAO, LENG, ZHANG, 2017; PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT, 2017). Dados publicados indicam que a imunotoxicidade de NMs está principalmente associada ao processo de inflamação em animais saudáveis e agravamento de patologias (FROEHLICH, 2015).

Farrera & Fadeel (2015) demonstram que NMs diversos, sofreram o processo de internalização quando interagiram com células imunes inatas. Segundo os autores, isso pode mistigar a toxicidade desses produtos, provocando um resultado falso negativo. Embora tenha havido muitos estudos examinando a nanotoxicidade de NMs para o sistema respiratório, há uma falta de conhecimento sobre a nanotoxicidade por exposição à pele, especialmente sobre os efeitos imunomoduladores que esses, podem ocasionar, potencializando o surgimento ou agravamento de alergias (YOSHIOKA et al., 2017).

Estudos tem demonstrado que NMs carregados negativamente induziram a liberação de TNF-α e lL-8 pelas células THP-1, enquanto ambas as partículas carregadas positivamente e negativamente poderiam ligar o fibrinogênio com alta afinidade (DENG, 2012).

Moléculas de citocinas também estão envolvidas nesse processo. Realizam funções na mediação e regulação da resposta imune e são geralmente reconhecidas como biomarcadores de imunotoxicidade. Embora a especificidade dessas citocinas seja de mediar substâncias químicas, pesquisas sobre sua aplicabilidade têm considerado sua utilização para prever e monitorar a imunotoxicidade de NMs artificiais (ELSABAHY, WOOLEY, 2013). As citocinas podem mediar respostas inflamatórias locais e sistêmicas, e também podem ser distribuídas ao longo da circulação para vários locais de atividade. A desordem resultante do sistema imunológico pode levar ao aumento da incidência de doenças autoimunes, alérgicas e até mesmo neoplásicas (BATISTA-DUHARTE; LINDBLAD; OVIEDO-ORTA, 2011).

Existem diversos estudos descritos na literatura referente à imunocompatibilidade e imunotoxicidade de NMs, contribuindo para o esclarecimento e compreensão dos efeitos desses produtos quando em contato com o sistema imunológico (DOBROVOLSKAIA et al., 2009; ENGIN et al., 2017; PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT, 2017). Essas informações são de total relevância para os estudos de sensibilização dérmica e esclarecimento do pontencial alergênico. Permitindo o uso em quantidade segura para a produção e planejamento de medicamentos e produtos acabados (DOBROVOLSKAIA; SHURIN; SHVEDOVA, 2016).

1.3 Sensibilização da pele – Dermatite de contato alérgica

Conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de classificação e rotulagem das Nações Unidas Produtos químicos (referente ao inglês "*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals-GHS",* 2017), o termo sensibilizante dérmico refere-se a uma substância que resultará em uma resposta alérgica após exposição repetida. Cabe ressaltar que sensibilização da pele é um termo usado para denotar os perigos regulatórios conhecidos como contato alérgico humano, dermatite ou hipersensibilidade quando avaliado em roedores, sendo, um importante parâmetro a ser considerado para a avaliação de risco de produtos químicos (OECD, 2012). O sistema GHS propõe que sensibilizantes, sejam categorizados em categoria 1 e se os dados

forem suficientes, existem as subcategorizações 1A, representando materiais altamente alergênicos e 1B, materiais de baixo e moderado potencial alergênico. Contudo, o ato público mencionado não descreve sobre essa subdivisão da categoria 1.

O inicio do processo de sensibilização dérmica ocorre através do evento de iniciação molecular, onde o produto químico, quando eletrofílico, possui a capacidade de penetrar no estrato córneo e reagir com as proteínas cutâneas e a sua hidrofobicidade (ROBERTS, SCHULTZ, et al., 2016). As substâncias químicas podem atuar de maneira indireta como sensibilizantes ou requererem algum nível de ativação sendo por processo abiótico, auto oxidação presente na pele ou biótica por biotransformação. Aquelas que se tornam eletrofílicas ativam o processo abiótico e são denominadas de pré-haptenos. Já, as que requerem metabolização pelo sistema enzimático celular são classificadas como pró-haptenos (OECD, 2012) podendo a mesma substância ativar os dois mecanismos, passando a ser classificada por pró-hepteno.

A manifestação clínica desencadeada por substâncias químicas sensibilizantes dérmicas, é a dermatite de contato alérgica. Frequente provocada por uma reação imune tardia de hipersensibilidade do tipo IV, mediada por células T contra químicos de baixo peso molecular, após exposição repetida. É caracterizada por duas fases diferentes, a fase de indução da resposta imune e a fase de estabelecimento da reação imunológica, referente à exposição repetida com o mesmo produto químico ou outro produto que apresente reatividade cruzada com o mesmo (OECD, 2016). É importante destacar que esta manifestação clínica pode provocar graves problemas clínicos e socioeconômicos (KOSTNER et al., 2017).

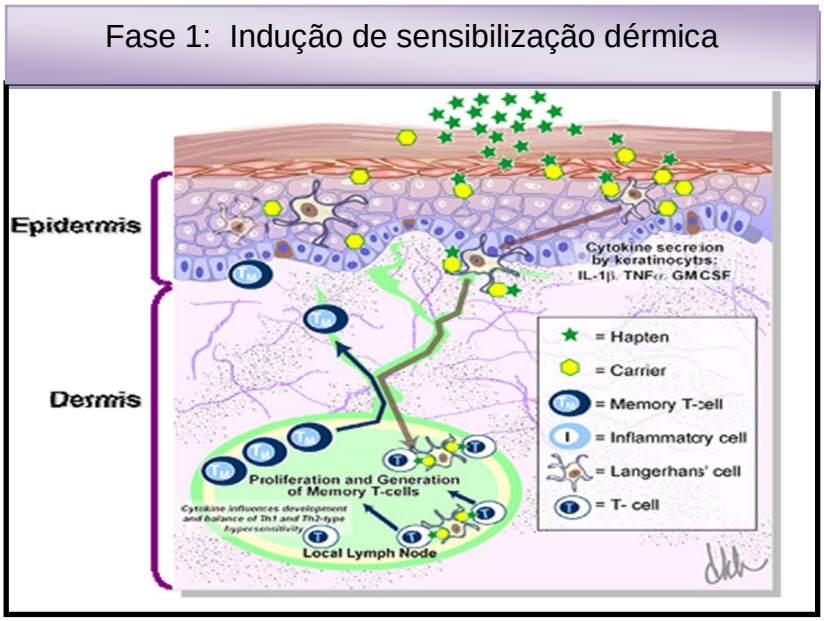
Na fase de indução, o produto químico ou alérgeno penetra na epiderme, camada externa da pele. Formando o complexo proteína-alérgeno, processo denominado de haptenação. Durante esta passagem, os produtos químicos estão potencialmente sujeitos a processos de biotransformação ou oxidação. Quando por via processos de metabolização enzimático ocorrido em células de queratinócitos, podem aumentar ou diminuir o potencial alergênico. O conjugado estável, é processado por células dendríticas epidérmicas (isto é, células de Langerhans) e dérmicas de forma direta ou indireta, via queratinócitos ativados (OECD, 2012).

Como consequência, diferentes respostas bioquímicas podem ocorrer durante esse processo. Nos queratinócitos ocorre a ativação de respostas inflamatórias via produção intracelular de interleucina (IL) -18 e aumento da expressão de genes citoprotetores via fator de transcrição Nrf2 (do inglês: *nuclear factor erythroid 2-related*

factor 2). Já nas células dendríticas, ocorre o processo de amadurecimento celular: aumento da expressão de marcadores de superfície de membrana específicos (ex.: CD86, CD54) e secreção de citocinas (ex.: IL-8, IL1β, IL-12p70). Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os nódulos linfáticos locais, apresentando as partículas alergênicas aos linfócitos T via complexo principal de histocompatibilidade. Esse evento induz a diferenciação e proliferação das células T de memória específicas ao alérgeno, algumas das quais recirculam por todo o corpo (OECD, 2014).

As células dendríticas exibem moléculas complexas de histocompatibilidade, que incluem parte do complexo hepteno-proteína para linfócitos T auxiliares (células T). Isso induz a diferenciação e proliferação de células T de memória específica de substâncias alergênicas, algumas das quais recirculam por todo o corpo (OECD, 2012). Células T de memória são acionadas para secretar citocinas específicas que induzem a liberação de citocinas inflamatórias e mobilização de células T citotóxicas, bem como outras células inflamatórias circulante do sangue (PEISER et al., 2012). A Figura 7 representa a primeira fase do mecanismo de desenvolvimento da dermatite.

Figura 7. Representação da fase de indução do processo de sensibilização.

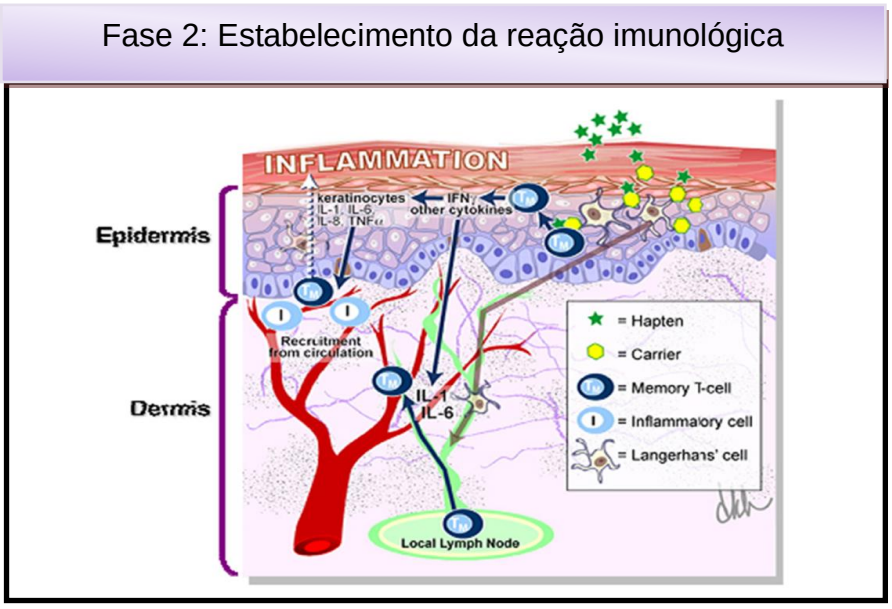


Fonte: OECD, 2012.

A fase de elicitação que corresponde ao estabelecimento da reação imunológica ocorre após o contato repetido com o antígeno. Assim, segue-se novamente a formação do complexo proteína-alérgeno e seu processamento pelas células

apresentadoras de antígeno, as quais o apresentam aos linfócitos T de memória circulante. A consequência bioquímica disso é a secreção de citocinas como INFγ, IL-1, IL-6, IL-8 e TNFα, as quais induzem a liberação de componentes moleculares e celulares inflamatórios e mobilização de células T citotóxicas presentes na circulação sanguínea. Na epiderme, há então indução de uma resposta inflamatória local caracterizada por reações como edema, erupções vermelhas e bolhas cutâneas (OECD, 2014). A fase de elicitação, caracterizada pelo o estabelecimento da reação imunológica, está esquematizada na figura 8.

Figura 8. Representação da fase de estabelecimento da reação imunológica.



Fonte: OECD, 2012.

Com o esclarecimento do mecanismo químico e biológico associados à sensibilização dérmica, foi possível conhecer as vias do efeito adverso (do inglês*: Adverse Outcome Pathway AOP*) envolvidas no processo de sensibilização dérmica. O AOP tem início com o evento-chave 1 e/ou evento de iniciação molecular relacionado à ligação covalente irreversível do alérgeno (ou seus intermediários reativos transformados por conversão abiótica ou metabólica) às porções nucleofílicas localizadas em proteínas dérmicas que resultam na formação do complexo hapteno-proteína (OECD, 2015), seguido do evento-chave 2 ou Inflamação epidermal por meio da via de sinalização de queratinócitos (OECD, 2015), o evento-chave 3, a ativação de células dendríticas por macadores de superfícies (OECD, 2018) e por último, o evento-chave 4, referente a ativação e proliferação de linfócitos T (OECD, 2010). É importante destacar que esses

eventos-chaves resultam no estabelecimento da dermatite de contato, sendo que outros processos bioquímicos e celulares podem estar envolvidos no processo de sensibilização dérmica (OECD, 2014).

1.4 Avaliação do potencial de produtos químicos de induzir sensibilização dérmica

Historicamente, a avaliação da sensibilização da pele envolveu a utilização de animais de laboratório. Os métodos clássicos, eram baseados no uso de cobaias, como o teste Draize (DRAIZE et al., 1959), o teste de Maximização de Cobaia (GMPT) e o teste de Buehler (TB) (OECD TG 406) e analisavam as fases de indução e elicitação da sensibilização da pele (OECD, 1992). Posteriormente, ensaios como o Linfonodo Local (LLNA) - TG 429 e suas modificações não radioativas LLNA:DA -TG 442A e LLNA: BrdU-ELISA e FCM - TG 442B (OECD, 2010) ganharam maior aceitação em comparação aos os métodos clássicos, GMPT e TB, por apresentar vantagens em termos de redução e refinamento do uso de animais, não necessitando do uso de adjuvante. A Tabela 1 apresenta modelos utilizados para avaliar reações alérgicas na pele usando camundongos para avaliação do potencial de materiais.

Tabela 1. Modelos usando camundongos para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas.

Testes de sensibilização dérmica	**Referências**
Popliteal lymph node assay (PLNA)	GLEICHMANN (1981)
Vitamin A acetate-fed mice assay	MILLER (1986)
Mouse ear swelling test (MEST)	GAD et al. (1986)
LLNA	KIMBER et al. (1986)
LLNA in situ	KIMBER et al. (1989)
Mouse ear swelling assay (MESA)	THORNE et al. (1991)
Sensitive mouse lymph node assay (SLNA)	IKARASHI et al. (1993)
LLNA- lymph node cell phenotyping IMDS	DE SILVA et al. (1993); SIKORSKI et al. (1996); GERBERICK et al. (2002) HOMEY et al. (1998)
Reduced LLNA (rLLNA)	KIMBER et al. (2006)
OECD 429 – LLNA	OECD (2010a)
OECD 442A – LLNA: DA	OECD (2010b)
OECD 442B – LLNA: BrdU-ELISA	OECD (2010c)
LLNA: BrdU-flow cytometry method (FCM)/ Immunohistochemistry	JUNG et al. (2010)
Ex vivo LLNA: BrdU-ELISA + cytokine analysis Modified IMDS	ULKER et al. (2011)
LLNA:DA plus elicitation phase (LLNA:DAE)	SCHÜMANN et al. (2014)
LLNA:DA plus elicitation phase (LLNA:DAE)	YAMASHITA et al. (2014); (2015)
Two-stage LLNA:DA	ZHANG et al. (2017)
LLNA – multi-endpoint evaluation	TSUCHIYAMA et al. (2017)
OECD 442B – LLNA: BrdU-ELISA/FCM	OECD (2018a)

Fonte: ÀVILA (2019)

É importante ressaltar que no guia de Sensibilização Cutânea em Camundongos, o ensaio local de linfonodos (LLNA: 429) foi adaptado em 2002 (OECD, 406). Esta diretriz, abrange o 4° evento-chave da sensibilização e inclui um conjunto de Padrões de desempenho (PD) que podem ser usados para avaliar o status de validação de métodos novos, e/ou modificados, funcionalmente e mecanicamente semelhantes ao LLNA, de acordo com os princípios do Documento de Orientação (ICCVAM, 2009). O LLNA pode apresentar vantagens sobre os ensaios envolvendo cobaias como o BT e GPMT quando se avalia o bem-estar animal, por ser uma técnica refinada e de redução ao uso de animais (OECD, 2010).

O LLNA representa a fase de indução da sensibilização da pele e fornece dados quantitativos adequados para avaliação dose-resposta. Uma abordagem reduzida de LLNA (rLLNA), que poderia usar até 40% menos animais também é descrita como uma

opção nesta diretriz (OECD, 2010). A técnica, pode ser usada quando há necessidade reguladora de confirmar uma previsão negativa do potencial de sensibilização da pele. Desde que haja aderência a todas as outras especificações do protocolo LLNA, conforme descrito nesta diretriz (ICCVAM, 2009).

O princípio básico do ensaio LLNA é a indução da proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos responsáveis por drenar o local de aplicação da substância, com possível potencial sensibilizante. O método consiste na a proliferação de linfócitos que por sua vez é proporcional à dose e à potência do alergênico aplicado, fornecendo uma medida quantitativa da sensibilização. A proliferação é medida comparando a proliferação média, encontrada em cada grupo teste, com a proliferação média no grupo controle, tratado com veículo (CV). A razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e no grupo CV simultâneo, denominada Índice de Estimulação (IS). IS deve ser ≥ 3 para ser considerado positivo (OECD, 2010).

O LLNA, é um método *in vivo* e, como conseqüência, não eliminará o uso de animais em a avaliação da atividade de sensibilização dérmica. Porém, oferece um refinamento substancial (possibilitando menor dor) sendo utilizado após a consideração de eventos imunológicos estimulados, diferentemente dos testes com cobaias (TG 406) (OECD, 1992; OECD, 2010). Além disso, o LLNA não requer o uso de um adjuvante, como é o caso do teste de maximização de porquinhos-da-índia (OECD, 1992; OECD, 2010).

Apesar das vantagens do LLNA em relação aos ensaios de cobaias (OECD 406) deve-se reconhecer que existem limitações que podem exigir o uso da diretriz 406 (OECD, 2010). Por exemplo, resultados falso-negativos no LLNA com certos metais, resultados falso-positivos com certos irritantes da pele e alguns produtos químicos do tipo surfactante (KREILING et al., 2008; OECD, 2010).

Após o ensaio do LLNA, surgiu o ensaio LLNA:DA, descrito pela a OECD TG 442 A. Uma modificação não radioativa desse modelo que quantifica o conteúdo de adenosina trifosfato (ATP), via bioluminescência, utilizada como um indicador de proliferação de linfócitos, não necessitando de timidina ou iodo radioisótopo para medir a proliferação de linfócitos T. O método de teste LLNA: DA foi validado, revisado e recomendado por um painel internacional de revisão, considerado útil para identificar substâncias sensibilizantes e não sensibilizantes da pele (ICCVAM, 2009; ICCVAM, 2010; OECD, 2010).

O LLNA (TG 429) e suas versões não-radioativos LLNA: DA (TG 442 A) e LLNA: BrdU-ELISA (TG 442 B) também fornecem uma vantagem sobre os testes em cobaia (TG 406) em termos de redução e refinamento do uso de animais. Os mesmos, avaliam a fase de indução da sensibilização da pele e fornece dados quantitativos adequados para avaliação da dose-resposta. Além disso, tem a capacidade de detectar sensibilizantes sem a necessidade de usar um radiomarcador para o DNA eliminando o uso de cobaias para teste, excluindo em alguns casos o uso da TG 406.

O ensaio LLNA: DA possui igual mérito aos demais ensaios anteriores a essa modificação, pode ser empregada como uma alternativa aos resultados positivos e negativos, porém requerem confirmação adicional (ICCVAM, 2009; ICCVAM, 2010). A diretriz também oferece um refinamento substancial e não requer que as reações de hipersensibilidade dérmica sejam elicitadas (OECD, 2010). Porém, como as demais técnicas, também possui limitações especificas que podem exigir o uso daTG 406, como por exemplo, na avaliação do uso de certos metais, resultados positivos, com certos irritantes da pele, algumas substâncias do tipo surfactante e baixa solubilidade e substâncias que afetam os níveis de ATP como por exemplo, inibidores de ATP e entre outras, previstas na OECD TG 442A (OECD, 2010).

Outra diretriz não radioativa do LLNA foi a TG do LLNA: BrdU-ELISA e o BrdU-FCM descrito pela a OECD TG 442B (OECD, 2018). Esta diretriz descreve duas modificações não radioativas para o LLNA, utilizando o método de 5-bromo-2-desoxiuridina não radiomarcada (BrdU), o ELISA, ensaio de Imunoabsorção Enzimática ou sistema de teste baseado no método de citometria de fluxo (FCM) para medir linfócitos T (OECD, 2018)

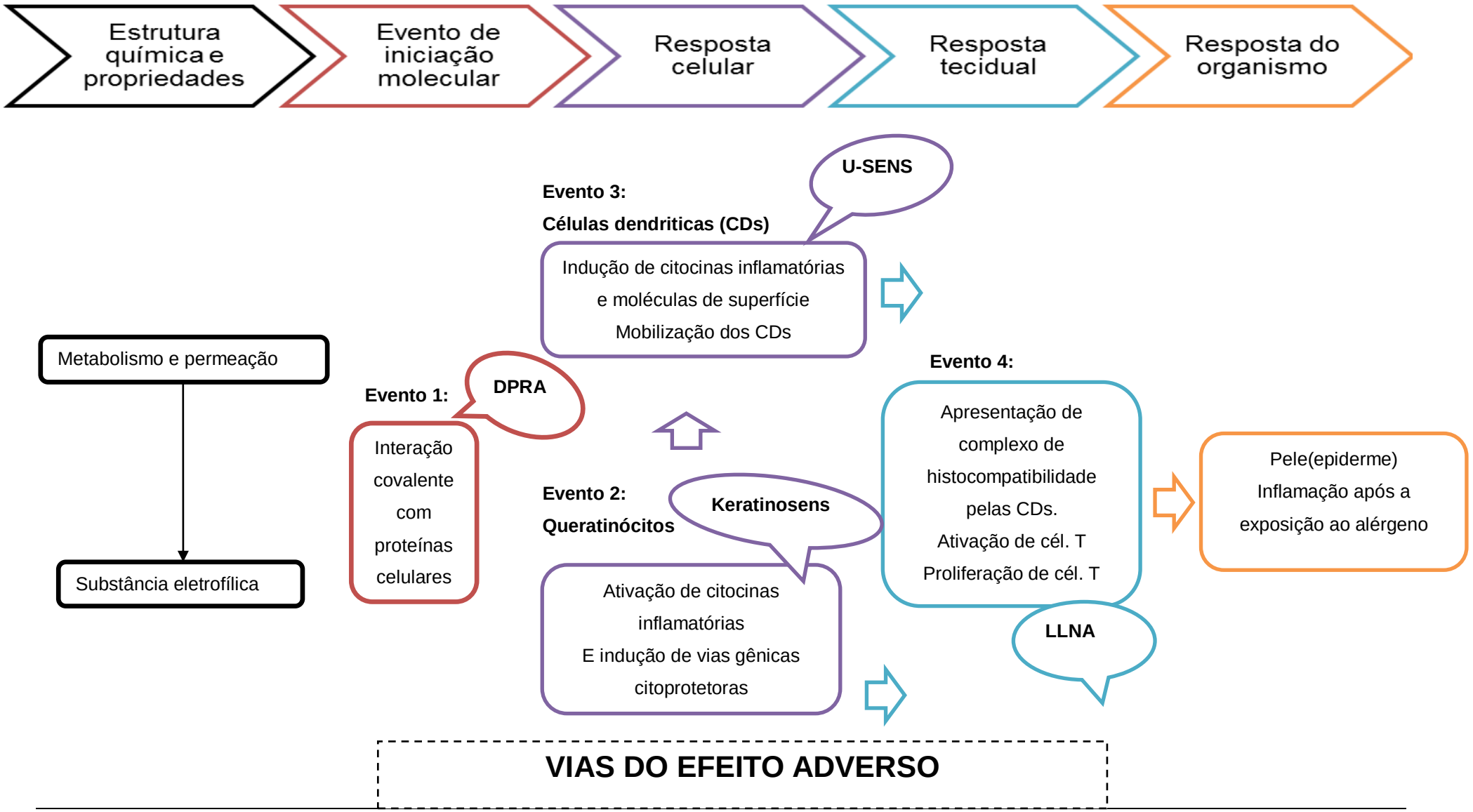
A técnica tem como finalidade identificar produtos com potencial sensibilizante de pele. Anterior a aplicação da técnica, o guia esclarece a necessidade de analisar as informações disponíveis sobre o produto químico que virá a ser utilizado, incluindo, a identidade da substância, a estrutura química do produto, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* sobre o produto químico e dados toxicológicos geral. Afim de determinar se o LLNA: BrdU-ELISA é apropriado para o teste químico. Sendo incompatível com os critérios do teste é necessário então utilizar o LLNA: BrdU-ELISA para auxiliar na seleção da dose (OECD, 2010; OECD, 2018).

O ensaio é de igual mérito, em comparação com os demais, e pode ser empregado como uma alternativa já que resultados positivos e negativos geralmente já

não requer mais confirmação. Porém, em alguns casos, o LLNA: BrdU-ELISA não deve ser usado no local dos testes LLNA radioativos ou porquinhos-da-índia (ou seja, TG 406) pois a técnica possue limitações para algumas substâncias, necessitando de testes com animais (ICCVAN, 2009; OECD, 2010).

Em 2012 a OECD publicou um Guideline das vias de efeito adverso (AOP) que associa duas ou mais técnicas para avaliar os eventos-chaves da sensibilização da pele, sendo razoavelmente aceitáveis e necessários para a análise de sensibilização dérmica (NEPAL et al, 2018). O esquema abaixo (figura 9) ilustra as técnicas utilizadas na avaliação de cada evento-chave do AOP.

Figura 9. Representação das técnicas utilizadas na avaliação de cada evento-chave da sensibilização dérmica.



Fonte: Autor próprio, 2019.

1.4.1 Ensaio direto de reatividade do Peptídeo (DPRA)

O Ensaio Direto de Reatividade do Peptídeo (OECD TG 442C) é o evento de iniciação molecular que aborda o primeiro evento-chave do AOP. Sendo o processo de haptenação uma reação covalente do alérgeno de contato com sítios nucleófilos. Os dados são expressos através da quantificação da concentração do peptídeo cisteina e lisina, após 24 horas de incubação com o produto químico a 25 ±2,5 °C. A concentração do peptideo é quantificada por cromatografia liquida de alta resolução (HPLC) com eluição de gradiente e detecção por UV a 220 nm. O ensaio categoriza o produto químico em não sensibilizante e sensibilizante, em uma das 4 classes de reatividade do ensaio (OECD, 2015).

Os estudos de comparação com métodos *in vivo* (LLNA) indicam uma precisão para o DPRA de 80% quando utilizado para discriminar não sensibilizantes de categoria 1. Com uma sensibilidade de 80% e especificidade de 77% (NATSCH et al., 2013; OECD, 2015). Com base nos dados gerais disponíveis, o DPRA mostrou ser aplicável a produtos químicos de teste abrangendo uma variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, propriedades físico-químicas e possíveis sensibilizantes (EC EURL-ECVAM, 2013 OECD, 2015).

A técnica possui limitações, uma vez que o teste não é aplicado em compostos metálicos, pois o mesmo, reage com os peptideos presentes na pele por outras vias mecanisticas, diferente da ligação covalente. Alem disso, substancias não soluveis em solvente estabelicidos pela a OECD, na concentração final de 100 mM, não pode ser avaliadas pela a técnica. No entanto, os produtos químicos não solúveis a essa concentração pode ainda ser testados em concentrações mais baixas. Nesse caso, um resultado positivo pode ser utilizado para apoiar a identificação do produto químico em estudo, porém, a falta de reatividade não deve ser definida apenas por um resultado negativo necessitanto de uma melhor avaliação (OECD, 2015). Sendo assim, o método deve ser combinado com outros ensaios *in vitro,* gerando informações complementares que abordam outros eventos-chave da sensibilização cutânea AOP.

Essas informações complementares e ensaios combinados estão descritos no documento de Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (*do inglês* IATA) para a categoria GHS. De acordo com o documento, quando não associados, esses ensaios não podem categorizar sensibilizantes 1A e 1B, classificando apenas na categoria 1 do GHS da ONU, dependedo do fim regulatório (JAWORSKA et al., 2013; OECD,2015).

1.4.2 Ativação de queratinocitos: KeratinoSens ™ e ARE-Nrf2 luciferase e LuSens

Os métodos KeratinoSens™, ARE-Nrf2 luciferase e LuSens, abrangem o mecanismo de ativação de queratinocitos abordando o segundo evento-chave do AOP para sensibilização da pele (OECD, 2018). O Guia inclui métodos usados para apoiar o discriminação entre sensibilizantes e não sensibilizantes da pele de acordo com a categoria GHS (GHS, 2013; OECD, 2018).

O ensaio, utiliza de uma linhagem celular aderente imortalizada derivadas de queratinocitos humanos que carregam em si, o gene AKR1C2 trancritor da luciferase sob o dominio da resposta antioxidante. Substâncias sensibilizantes regula positivamente este gene, permitindo sua ativação, por meio da luciferase, dependentes de NrF2 (DINKOVA-KOSTOVA; HOLTZCLAW; KENSLER., 2005; OECD, 2018). O processo de ativação em queratinocitos, resulta em respostas inflamatórias, bem como alterações na expressão gênica associada a vias de sinalização celular específicas, como o antioxidante / eletrófilo, vias dependentes do elemento de resposta (ARE). Ou seja, a via Keap1-Nrf2 é o principal regulador das respostas citoprotetoras ao estresse oxidativo e eletrolítico (KANSANEN; KUOSMANEN; LEINONEN; LEVONEN et al., 2013).

O domínio de aplicação da técnica, demonstra uma boa precisão ao avaliar produtos químicos solúveis ou que formam uma dispersão estável no meio de exposição, isto é, um colóide ou suspensão em que o produto químico, não se separa do solvente em diferentes fases (OECD, 2018). Natsch e colaboradores (2013) correlacionam dados de KeratinoSens™ com as classificações do LLNA, com um conjunto de 145 produtos químicos. O estudo comparativo, demonstrou uma precisão de 77%, com sensibilidade 79% e especificidade de 72%. O teste obteve uma reprodutividade de 88% em diferentes laboratórios, resultando em uma precisão de 77%, sensibilidade 78% e especificidade 76% do KeratinoSens ™ de acordo com a categoria GHS (EURL ECVAM, 2014).

Dados submetidos pelo EURL ECVAM (2015) ressaltam que o método é util para contribuir com a indentificação do potencial alergênico. Entretanto, os valores de precisão dos dados, são apenas indicativos, quando usado individualmente. Necessitando do uso de abordagens testes e previsões complementares para concluir o potencial de sensibilização dermica de produtos químicos (OECD, 2018).

O ensaio LuSens (BAUCH et al., 2012) também avalia a atividade do fator de transcrição Nrf2 para prever químicos alergênicos, apresentando capacidade preditiva comparável ao KeratinoSens™ (RAMIREZ et al., 2014). Método semelhante ao do

KeratinoSens™. No entanto, o ensaio utiliza a linhagem de células LuSens, derivada de células HaCaT portadoras do gene da luciferase, sob o controle da ARE do gene de rato NADPH: quinona oxidorredutase 1 (NQO1). Sobre a precisão do ensaio, quando comparado com resultados em humanos, o LuSens mostrou uma precisão de 83% , com sensibilidade de 83% e especificidade de 81% (RAMIREZ et al., 2014).

1.4.3 Teste de ativação da linha celular humana (h-CLAT), Teste de ativação da linha de células U937 (U-SENS ™) e Ensaio de avaliação de Interleucina-8 (ensaio IL-8 Luc)

Descritos pela a diretriz TG 442E, descreve o terceiro evento-chave da sensibilização. Os testes *in vitro* abordam os mecanismos envolvido no evento de ativação de células dendríticas (CD) (OECD, 2017). Inclui métodos que discriminam sensibilizantes e não sensibilizantes cutâneos, de acordo com a categoria GHS da ONU (GHS, 2017). Esses métodos tem como princípio, quantificar a mudança na expressão dos marcadores da superfície celular associado ao processo de ativação de monócitos e células dendrídicas, por meio de marcadores CD54, CD40, CD80, CD83 e CD86; alterações na expressão de IL-8, e outras citocinas pro-inflamátorias, IL-1β e TNF-α, e quimiocinas, incluindo CCL3 (OECD, 2015; OECD, 2017).

O teste de Ativação da Linhagem U937 (U-SENS™) adaptado pela OECD, disposto no Guideline 442E de 9 outubro de 2017. Tem como princípio, quantificar as alterações do marcador de superfície celular CD86 em uma linhagem celular de linfoma histiocítico humano (U937), após um período de 45 ± 3 horas de exposição ao sensibilizante dérmico. As alterações da expressão desse marcador de superfície celular CD86 são medidas por citometria de fluxo, após a marcação com os anticorpos específicos, e o corante de viabilidade celular iodeto de propídeo (OEDC, 2017).

Dados gerados com os métodos descritos neste Guia de Teste são propostos para apoiar a discriminação entre sensibilizantes cutâneos (ou seja, categoria 1 do GHS da ONU) e não-sensibilizantes. Entretando, resultados gerados por meio da ativação de células dendriticas, não são suficientes para concluir sobre o possível potencial alergênico de produtos químicos (OECD 2012). Sendo necessária a associação de demais eventos para garantir a segurança dos resultados. O documento de Abordagens de Teste e Avaliação (IATA) foi descrito para esclarecer a necessidade de utilizar outras informações

complementares derivada de *ensaios in vitro* que abordam outros eventos-chave da AOP e a leitura comparativa de análogos dessas sustâncias (OECD, 2016).

De acordo com o regulamento da GHS, os métodos descritos não podem ser utilizados para avaliação de segurança, ou subcategorizar os sensibilizantes da pele nas subcategorias 1A e1B (OECD,2012). No entanto, dependendo da etapa de regulamentação, resultados positivos podem ser aceitos para classificar apenas o produto químico na categoria 1 GHS (GSH, 2015).

Sobre a precisão do ensaio U-SENS, quando comparados com os resultados LLNA, demonstrou uma precisão de 86% na distinção de sensibilizantes da pele (ou seja, UN GHS Cat.1) com uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 65%. Em comparação com os resultados em humanos, a precisão na distinção dos sensibilizantes da pele (ou seja, UN GHS Cat.1) a previsão de não sensibilizantes foram 77% com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 47%. É necessário ressaltar que falsas previsões negativas, comparando o LLNA com o U-SENS ™ são mais prováveis mostrando uma baixa ou moderada potência de sensibilização da pele, incluindo a substância na subcategoria UN GHS 1B. Diferente de produtos químicos que demonstraram um elevado potencial de sensibilização da pele, isto é, quando classificado na subcategoria 1A do GHS da ONU (ALÉPÉE, 2015; REISINGER, 2015; TAKENOUCHI, 2015).

Sobre a precisão do ensaio h-CLAT quando comparado com ensaios em animais (LLNA) demonstraram uma precisão na distinção de sensibilizantes cutâneos de categoria 1 do GHS. Quando classificados como não sensibilizantes, a precisão do teste foi de 85% com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 66% EURL ECVAM (2015) considerando todos os dados existentes e excluindo resultados negativos com um *Log Kow* superior a 3,5. Os dados demonstraram que resultados falsos negativos são mais prováveis quando se referi a produtos químicos com baixo e moderado potencial de sensibilização (ou seja, subcategoria 1B do GHS da ONU) do que em produtos químicos que exibem um potencial elevado (ASHIKAGA et al., 2010; EC EURL ECVAM, 2012; TAKENOUCHI,2015).

São notórias as mudanças ocorridas em relação as metodologias utilizadas na avaliação do potencial de alergenicidade. Percebe-se que com o avanço cientifico, tem sido propostas novas abordagens e metodologias para avaliação de produtos quimicos mecanisticamente baseados em métodos *in vitro* e *in vivo,* que foram considerados cientificamente válidos para a avaliação do risco de sensibilização da pele, e estas

técnicas têm sido empregadas conjuntamente para a investigação em Abordagens Integradas de Testes e avaliação (*do inglês* Integrated Approaches to Testing and Assessment- IATA). A avaliação integrada é necessária para poder substituir totalmente os testes em animais. Atualmente, a cobertura mecanicista restrita do AOP envolve métodos disponíveis para ensaios animais e não animais.

A falta de harmonização para a avaliação da toxicidade de NMs ressalta a importância de desenvolver métodos que possam ser capazes de esse parâmetro. O desenvolvimento de novos métodos é uma tarefa enorme e onerosa, portanto, é necessário tentar empregar métodos já existentes e validados, desenvolvidos para produtos químicos (MANNERSTRÖM, et al., 2016). Ensaios *in vitros* podem oferecer a possibilidade de rastrear a toxicidade de NM, limitando o número de testes *in vivo* (GALBIATI, VALENTINA et al., 2018). Porém, o grande questionamento é se realmente métodos *in vitros* utilizados na análise de alergenicidade em substâncias solúveis são capazes de avaliar NMs, já que esses NMs não estão incluídos nos domínios de aplicação desses testes.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial alergênico de NMs (TiO_2, NTCPS e C60) por meio de métodos inovadores, livres de animais, com validação regulatória e/ou cientifica.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização dos NMs;
- Investigar internalização celular em NMs por microscopia de campo escuro;
- Investigar o potencial de NMs em modular o primeiro evento-chave da sensibilização da pele por meio da técnica mDPRA;
- Investigar o potencial de NMs em modular o terceiro evento-chave da sensibilização da pele utilizando a metodologia U-SENS^{TM};
- Analisar o potencial de NMs em modular o sistema imunológico por meio da técnica de quantificação de citocinas inflamatórias.

3 MÉTODOS

3.1 Reagentes adquiridos

Os NMs NTCPS (pureza > 98%) (CAS 308068-56-6), o C60 (98% de pureza) (CAS 99685-96-8) e o TiO_2 (pureza 99.99%) (CAS 1218841-9) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Ademais, os peptídeos lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) e cisteína (Ac- RFAACAA-COOH) (ambos com pureza > 95%) utilizados no teste in químico para interação peptídeo-nanomaterial foram obtidos no Genome Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O hidróxido de amônio pela a Qhemis (Indaiatuba, SP, Brasil) e em seguida a acetonitrila e ácido trifluoroacético foi adquirido no Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, EUA). Substâncias como o acetato de amônio, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico ultilizados para produzir os tampãos foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

Para o teste do CBA, foi utilizado Triton X-100 e basic red 51 adquirido da Amresco (Solon, OH, EUA) e Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA), TrypLE™ respectivamente. Solução enzimática Express foi adquirida da Life® Technologies (Gibco®, NY, EUA). O fator humano estimulante de colônia granulócito-macrófago (human granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) e IL-4 utilizados na cultura de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico foram adquiridos pela PeproTech (Rocky Hill, NJ, EUA). Produto para quantificação de IL-8 (Human IL-8 ELISA Set),

Na avaliação do marcador CD86, foi utilizado o iodeto de propídeo, anticorpos anti-humanos conjugados com FITC CD86 (FUN-1) adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

3.2 Linhagem celular

Para o presente estudo foram utilizadas células de queratinócitos humanos imortalizados (linhagem HaCaT) e células mielóides humanas (linhagem U937) e fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3, ambas provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células HaCaT, 3T3 e U937 foram mantidas em meio de cultura completo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (linhagens HaCaT e 3T3) ou Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (RPMI-1640)

(linhagem U937) suplementado com soro fetal bovino (10%, v/v) inativado pelo calor (56ºC por 30 min), penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de poliestireno 75 cm^2 sob condições estéreis e mantidas em estufa de cultura celular com 5% CO2, 37 ºC, 90% de umidade.

A manutenção da linhagem U937 foi realizada três vezes por semana, sendo semeada em uma concentração definida (1,5 a 10^5 células/mL) a cada manutenção. A manutenção dos fibroblastos 3T3 foi realizada 3 vezes por semana à uma concentração celular de 0,5 x células/mL. Quando a confluência celular atingia cerca de 70-80%, a remoção das células das garrafas de cultivo era realizada utilizando solução de tripsina/EDTA (0,025%:0,02%, p/v) diluída em tampão fosfato (1:1).

Em relação às células HaCaT, a manutenção foi realizada simultaneamente 3 vezes por semana e, inicialmente, eram semeadas a uma concentração de 1 x 10^5 células/mL e quando a confluência celular atingia 70%, eram retiradas da garrafa com tripsina seguindo para desativação da mesma e lavagem das células. Que em seguida eram ressuspendidas em 1 mL e analisada utilizando contador automático T C20™ (Hercules, CA, EUA). Conforme recomendações do fabricante as células só eram utilizadas para os testes quando apresentavam uma viabilidade ≥ 90%.

3.3 Dispersão dos nanomateriais

Para a realização dos estudos, os NMs foram dispersados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich). Para favorecer uma melhor dispersão, a amostra de 200 µg/ml foi colocada em um sonicador de probe de titânio (*MISSONIX – Ultrasonic Liquid Processone*) com amplitude de 25 e energia de 202 J inicial subindo gradualmente, em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra. O período de sonicação foi de 30s, com intervalos de 1 minuto no tempo total de 5 minutos. O produto final apresentou dispersão considerada, sendo homogêneo quando observado visualmente.

3.4 Caracterização das amostras

As amostras foram dispersas em meio na concentração de 200µg/mL e investigadas quanto o diâmetro e homogeneidade utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) no aparelho *Nanosize,* permitindo a averiguação do tamanho NMs. Para caracterização da carga de superfície utilizou-se a técnica de análise do

rastreamento de nanopartículas (nanosight NTA NS 500). Para a realização da análise, as amostras foram diluídas 5 vezes em PBS 1X com a concentração incial de 200μg/mL. Em seguida, inseridas na câmara de visualização.

3.5 Teste de internalização celular

A tecnologia Cytoviva utiliza a iluminação de ângulo oblíquo para criar imagens de campo escuro de alta resolução e melhor relação sinal-ruído. A técnica usada foi projetada para observação ótica da interação dos NMs NTCPS, TiO_2 e C60 com as células de fibroblastos balb/3T3. As células foram cultivadas na densidade de 1 $x10^5$ em meio DMEM com 2 mM L - glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). O cultivo foi realizado em lamínulas de vidro, em placas de 6 poços e as células foram expostas à concentração de 200 µg/mL, para possibilitar a visualização.

Após a exposição de 2 horas, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS (1X) em temperatura ambiente e cuidadosamente retiradas da placa e posicionadas em lâmina de vidro que em seguida foram seladas para observação em microscópio óptico Olympus XP43 acoplado. Como controle, foram observadas células não tratadas. As imagens foram obtidas usando magnificação de 100x e 60x por meio do software Q-capture. As imagens capturadas foram comparadas quanto à presença do brilho respectivo de cada NM, obtido de imagens feitas isoladamente.

3.6 Ensaio direto de Reatividade do Peptídeo (mDPRA) ensaio baseado na OECD 442C

O mDPRA (micro- DPRA) é um teste adaptado e baseado na OECD 442 C (OECD, 2015), modificado por Àvilla e colaboradores (2017) que permitiu à análise *in vitro* do NM em contato com os peptídeos cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) obtidos a partir de Genone Biotechnologies (RJ, Brasil). A acetonitrila de grau HPLC e ácido trifluoroacético (ATF) foram obtidos da Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, EUA). Acetato de amônia, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

Foi usado um cromatógrafo Varian ProStar (Palo Alto, CA, EUA) equipado com um amostrador automático (modelo PS410), detector UV-visível (modelo PS325) e uma bomba quaternária (modelo PS240). O volume injetado para todas as amostras foi de 10 µL na coluna C18 (3,0 x 150 mm, 5,0; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As

temperaturas do amostrador automático e coluna foram 25 e 30ºC, respectivamente. A fase móvel consistiu em 0,1% (v / v) de ATF em água ultrapura (A) e 0,085% (v / v) de acetonitrila (B), ambos a 0,35 mL / minutos. Para a separação dos peptideos, um gradiente de 10 a 25% (B) ao longo de 10 minutos.

Quadro 1. Proporções definidas dos componentes da fase móvel (fase aquosa A e fase orgânica B) usada na análise cromatográfica das amostras para realização do ensaio de reatividade de proteínas.

Tempo (minutos)	Fase aquosa (A)	Fase orgânica (B)
0	90	10
10	75	25
11	10	40
13	10	90
13,5	90	10
20	**Fim da análise**	

Fonte: Autor próprio, 2019.

Antes da corrida, todo o sistema foi equilibrado a 30ºC com as fases A e B (1: 1) por 2 h. Além disso, a coluna foi reequilibrada sob condições iniciais durante 7 minutos entre as injeções. Os cromatogramas foram extraídos a 220 nm. A quantificação foi realizada usando o software Galaxie Chromatography Data System versão 1.9.302.952 (Palo Alto, CA, EUA). O ensaio foi realizado de acordo com um protocolo previamente descrito por De Ávilla e colaboradores (2017), baseado na OCDE Nº 442C (OECD, 2015) e no protocolo DPRA DB-ALM Nº 154. O laboratório possui proficiência na técnica preconizada na OECD 442C, para tal, avaliou 8 substâncias conhecidas, sendo negativos para sensibilização dérmica (hexano, propilenoglicol, N, N -dimetilformamida e piridina) e positivos para sensibilização (eugenol, 2,4-dinitroclorobenzeno e oxazolona) (DE ÀVILLA el tal., 2017).

O controle positivo foi a *p*-fenilenodiamina (PPD). As referências foram injetadas duplicadas referências B (peptideo e tampão) e referências C (acetonitrila e peptideo). Os controles de co-eluição (CO-EL) compostos de 40 µL de acetonitrila e10 µL de NMs dispersos em acetonitrila e 150 µL de tampão de lisina e cisteína separadamente. A substância teste com o peptideo foi injetada em triplicata e o CO-EL foi injectado 1 vez em HPLC . A depleção negativa foi considerada como zero. O valor médio de depleção do peptídeo foi utilizado para classificar cada NMs como negativo ou positivo e para determinar sua classe de reatividade, conforme definido pela OCDE TG 442C (tabela 2):

Tabela 2. Modelo de Predição *in chemico* o ensaio direto de reatividade do peptídeo adaptado para mDPRA

Media de depleção de cisteína/lisina (%)	Classe de reatividade	Modelo de predição *
0 < depleção ≤ 6,38	Mínimo	Negativo
6,38 < depleção ≤ 22,62	Baixo	Positivo
22,62 < depleção ≤ 42,47	Moderado	Positivo
42,47 < depleção ≤ 100	Alto	Positivo

*****modelo preditivo baseado na OECD N° 442 (OECD, 2015)

3.7 Ensaio de ativação de células dendríticas pela a técnica U-SENS™ (OECD 442E)

Para a avaliação da ativação de celulas dendriticas foi utilizado, a linhagem celular humana mielóide U937 (CRL-1593.2) foram cultivadas em RPMI1640 (Gibco) suplementada com 10% de soro fetal bovino inativado (FCS, BioWest), com 2 mM L - Glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). A expressão de CD86 em células U937 após a exposição a materiais teste foi avaliada usando U-SENS™ (OECD, 2018).

Anterior a realização do experimento, foi realizada o ensaio de proeficiência do laboratório, com substâncias conhecidas como, sensibilizantes de pele (resorcinol, fenilenodiamina, maleato dietilo e alcool cinâmico) e não sensibilizantes (ácido salicílico e ácido lático) para demonstrar a eficiência do laboratório na execução da técnica. Posteriormente, foi realizado o ensaio de citotoxicidade dos materiais a fim de determinar o seu CV70 (concentrações de cada material teste que mantém a viabilidade celular de 70%). As células foram cultivadas em RPMI em estufa de cultivo nas condições de 37 °C, 5% de CO2, 95% de umidade e utilizadas para o teste com no mínimo duas semanas após o descongelamento. A sua viabilidade e crescimento foram monitorizados (utilizando exclusão de tripano azul) em cada passagem a cada dois ou três dias (respectivamente a 3 x 10^5 células / mL ou 1,5 a 10^5 células / mL).

O experimento foi realizado em triplicata em 5 concentrações diferentes (200, 175, 150, 100 e 50) não citotóxicas de acordo com os critérios da OECD (2017). Os NMs foram incubados com células U937 (100 µl / poço) em uma placa de 96 poços por 45 horas a 37 ° C, 5% de CO2 e 95% de umidade. Simultaniamente foram incluídos o controle negativo, ácido lático (Sigma-Aldrich), e o controle positivo, resorcinol (Sigma-Aldrich) na concentração respectiva de 200 µg / mL. Após a incubação, as células foram transferidas para uma placa de microtitulação em forma de V e centrifugadas (1500 RPM, 5 min, 4 C) e os sobrenadantes foram descartados.

As células foram ressuspensas em PBS com 5% soro fetal bovino (SFB), e adicionado as soluções de anticorpo monoclonais conjugados com FITC CD86 (Clone: MOPC-21 da Becton Dickinson Pharmingen) na proporção de 5 µL/poço, por um periodo de incubação de 30 minutos no escuro, seguidas de centrifugadas (1500 RPM, 5 min, 4 °C), e lavadas duas vezes em 100µL de PBS com 5% de SFB para serem finalmente ressuspensas em PBS. Durante as etapas de coloração e lavagem, todos os tampões e células foram mantidos em gelo ou a 4 ° C.

A solução para análise usando o citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, Biosciences, San Jose, CA, EUA) registrou 10.000 eventos. As células não viáveis (IP) foram excluídas da análise de expressão de CD86. Os dados foram calculados como índice de estimulação (IE) de acordo com a seguinte equação:

Figura 10: Equação do índice de estimulação (IE) do marcador CD86.

$$IE = \frac{\%\text{ de CD86 em células tratadas} - \%\text{ de isótipo em células tratadas}}{\%\text{ CD86 em células controle} - \%\text{ de isótipo em células controle}} X100$$

Fonte: Autor próprio, 2019.

Uma resposta positiva para a sensibilização da pele foi considerada quando IE ≥ 150%. EC150, concentração na qual o material de teste induziu um IE de 150%, também foi obtido através de uma regressão linear.

3.7 Investigação do potencial de NMs de modular citocinas inflamatórias pelo método CBA

As células U937 foram semeadas na concentração de 5 x 10^5 células / poço em placas de cultura de 24 poços e pré-tratadas com três diferentes NMs em concentrações de 200, 150, 100 µg por 24 horas. Após a incubação, foram lavadas duas vezes com PBS (1 mL / poço) e os lisados celulares foram obtidos utilizando 250 µL/poço de solução de PBS contendo o Triton X-100 0,5% em PBS 1X, acrescido de um coquetel inibidor de protease). Os lisados celulares foram armazenados a -80 °C.

Os níveis de citocinas (TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL10 e IL-12p70) foram medidos por um citômetro de fluxo usando um kit de citocinas inflamatórias humanas do array de esferas citométricas BD (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Cada nível de citocina (pg) foi expresso com base no teor total de proteína intracelular (mg), que foi medido pelo kit de ensaio de proteína de ácido bicinconínico Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 Análise estatística

Os dados são expressos como média ou mediana ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism 5 (versão 5.0) A variação intergrupo foi medida por análise de variância one-way ANOVA e tukey um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

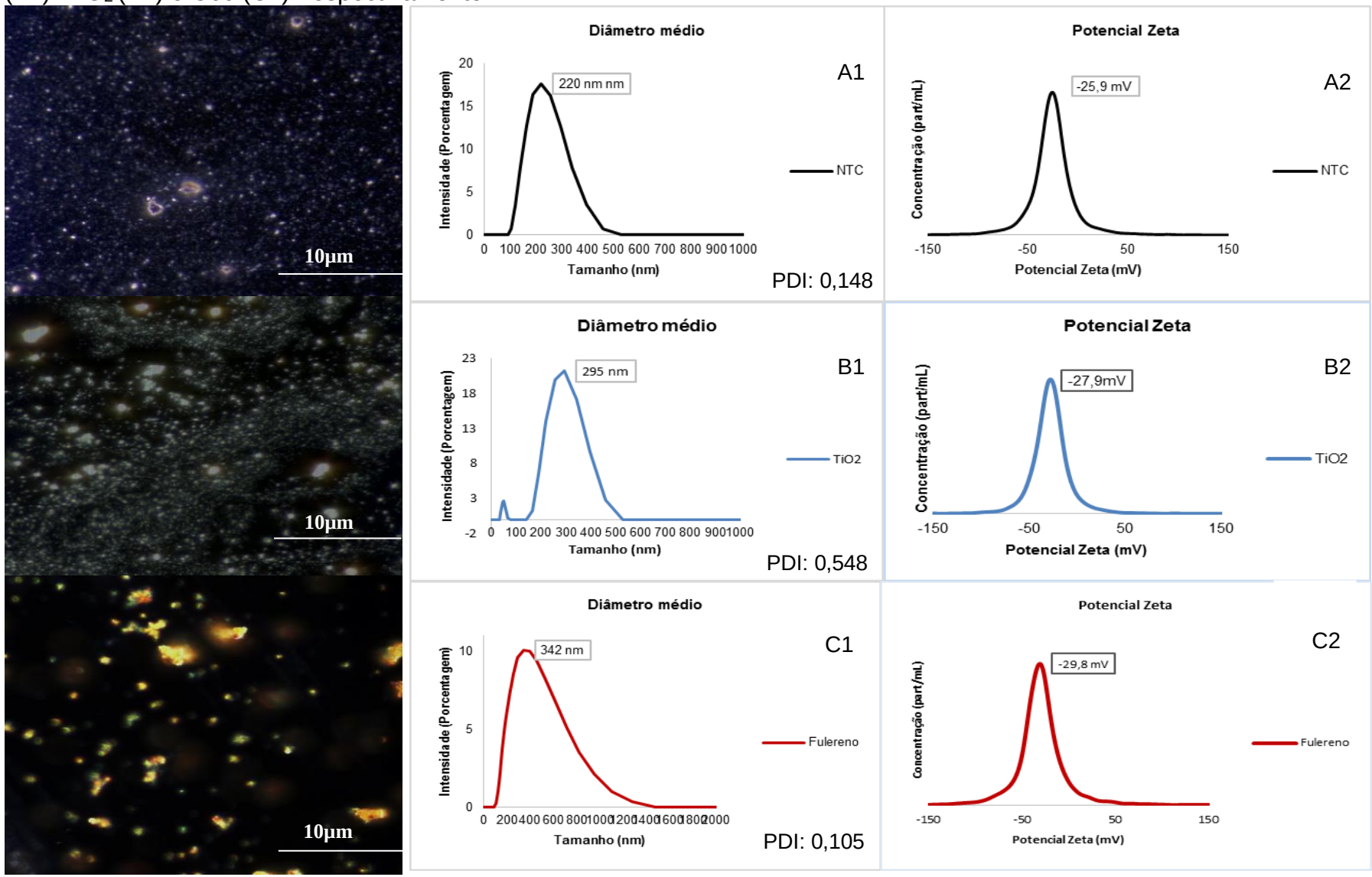
4 RESULTADOS

4.1 Descrição dos nanomateriais

Os NMs dispersos em meio aquoso na concentração de 200 µg/Ml analisados por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Malvern Zetasizer) e NTA (nanoSight NS500) demonstraram o diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta nas sequências NTCPS, TiO_2 e C60 respectivamente apresentados na figura 11. Nas imagens A1, B1 e C1 estão o diâmetro, ja nas imagens A2, B2 e C2 respectivamente estão os valores do potencial zeta.

Os dados abaixo indicam que os NMs estão dispersos de maneira homogenea quando aplicados às células obtendo um índice de polidispersão para NTCPS (0,148), C60 (0,105) e TiO_2 (0,548) e tamanhos (Descritos na figura 11). Os valores da descrição realizada não foram semelhantes aos valores apresentados nos produtos adquiridos, sendo descritos como tamanho <100 nm, o que surgere que ocorreu aglomeração do material, porém isso não prejudicou a internalização celular dos mesmos, bem como, os testes de sensibilização dérmica.

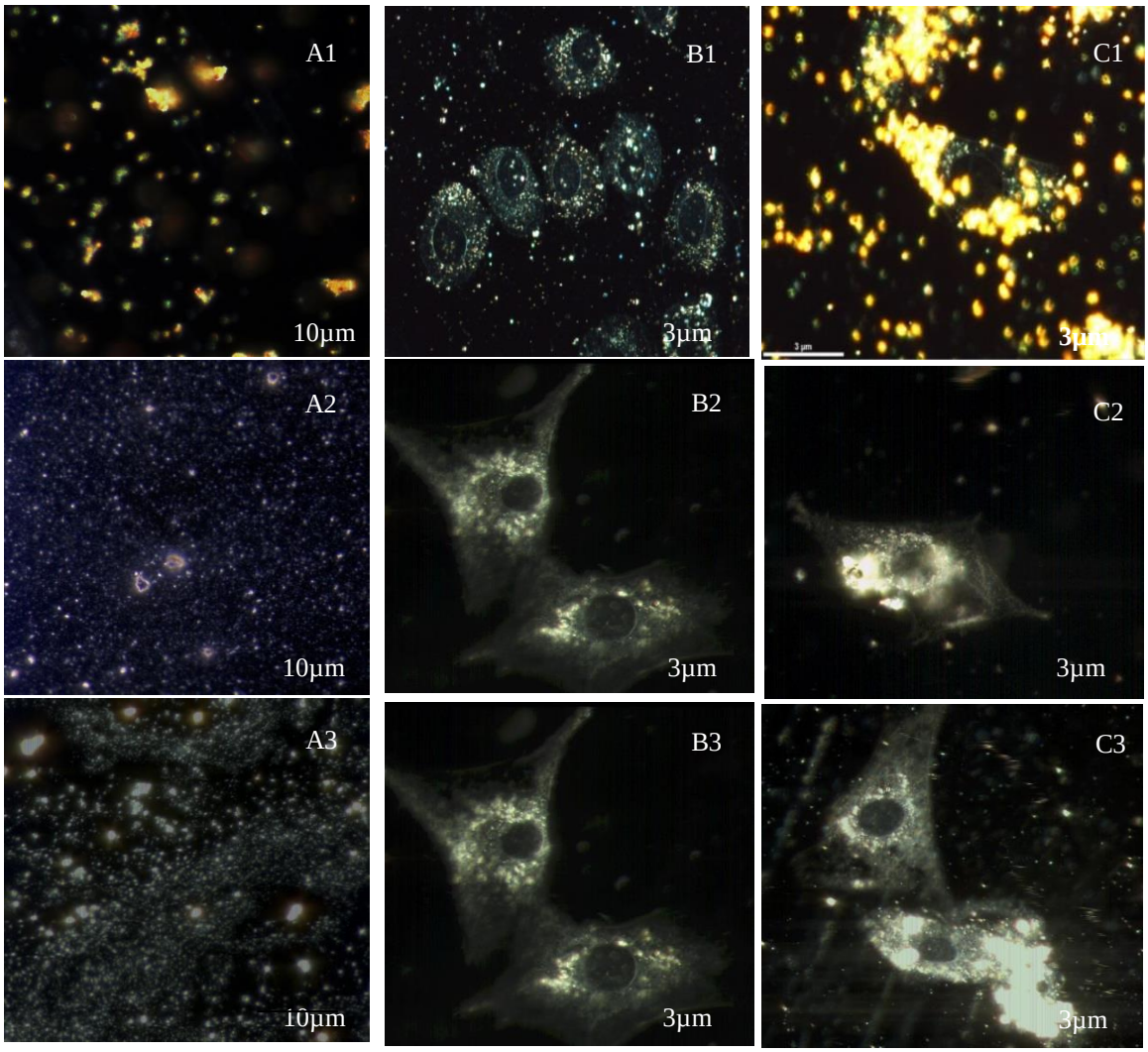
Figura 11. Representa o diâmetro de cada NM seguindo de NTCPS (A1) TiO_2 (B1) e C60 (C1) isoladamente e o potencial zeta (NTCPS (A2) TiO_2 (B2) e C60 (C2) respectivamente.



4.2 Internalização celular

As imagens obtidas por microscopia de campo escuro, no Cytoviva, após a exposição dos NMs nas células de fibroblasto Murino 3T3/balb na concentração de 200 µg/mL, estão apresentadas na figura 12. As imagens A1, A2 e A3, representam os C60, NTCPS e TiO_2 isoladamente, respectivamente. Já as imagens B1, B2 e B3, apresentam as células não expostas aos NMs. Sequencialmente, as imagens C1, C2 e C3 representam o C60, NTCPS e TiO_2 após a exposição de 2 horas nas células. A figura 12 Representa a diferença de brilho respectivo dos particulados (coluna A) em comparação com o brilho encontrado nas células da coluna C, indicando a presença do NMs respectivos no interior das células, sugerindo que houve internalização dos NMs.

Figura 12. Representação do ensaio de internalização celular realizado em células de fibroblastos 3T3/balb. As imagens A1, A2 e A3, representam os NMs isoladamente do C60, NTCPS e TiO2, respectivamente. Já as imagens B1, B2 e B3, mostram as células sem exposição. Nas imagens C1, C2 e C3, foram apresentadas células expostas aos NMs C60, NTCPS e TiO2 respectivamente.



4.3 Análises de sensibilização dérmica

Para a investigação do potencial de indução de sensibilização dérmica dos NMs foi realizado o ensaio mDPRA. Anterior a execução do teste, foi realizada a proeficiência no laboratório do teste mDPRA por Àvilla e colaboradores (2017) baseado no guia teste da OECD 442C, utilizando sete substâncias químicas, reconhecidas como não sensibilizantes da pele (hexano, propilenoglicol, N, N -dimetilformamida e piridina) e como sensibilizantes (eugenol, 2,4-dinitroclorobenzeno e oxazolona). Os dados obtidos no ensaio de proficiência, demonstram que os produtos químicos foram corretamente classificados com base em um ensaio de depleção de cisteína e peptídeo lisina.

Em relação ao material teste, conforme apresentado na Tabela 3. O ensaio mDPRA foi capaz de categorizar todos os NMs avaliados. Classificados como positivos sensibilizantes, na classe de reatividade moderada. Além disso, vale apena ressaltar que verificou-se uma maior depleção peptídica para cisteína do que para a lisina.

Tabela 3. Porcentagem de depleção de peptídeos sintéticos após exposição a NMs.

Material teste	**%Depleção**		**%Média LYS & CYS**	**Predição***
	LYS	**CYS**		
Controle positivo PPD	24,08 ± 0.49	100 ± 0	62,04	Positivo (Alto)
Controle negativo Piridina	8,95 ± 5,24	0,29 ± 0,51	4,62	Negativo
C60	7,57±0,33	57,57±0,96	32,57	Positivo (moderado)
TiO_2	5,54±0,22	50,55±0,75	28,05	Positivo (moderado)
NTCPS	12,33±0,20	38,94±0,51	25,64	Positivo (moderado)

*Modelo de previsão baseado não OCDE N ° 442C (OCDE, 2015)

Em relação ao U-SENS^{TM}, terceiro evento-chave, conforme orientações da OECD antes da realização do teste, foi realizada a proficiência do Laboratório, utilizando 8 substâncias químicas reconhecidas como sensibilizantes da pele (resorcinol, fenilenodiamina, maleato dietilo e alcool cinâmico) e os não sensibilizantes (ácido salicílico e ácido lático), baseado no indice de estimulação do marcador CD86, conforme apresentado na Tabela 4. As substâncias foram corretamente identificadas demonstrando que o o Laboratório possui capacidade técnica para a execução do ensaio conforme a OECD TG 442E (Tabela 4).

Tabela 4. Proficiência da técnica U-SENS^{TM} de acordo com OECD 442E.

Material teste	Solvente	U-SENS^{TM} Resultados		
		CV70 (µg/mL)	EC150 (µg/mL)	Predição*
Resorcinol	Meio	>200	23,50	S
Fenilenodiamina	Meio	>30	12,60	S
Maleato de dietilo	DMSO	>20	11,50	S
Álcool cinâmico	DMSO	>100	59,12	S
Acido salicílico	DMSO	>200	-	NS
Acido lático	Meio	>200	-	NS

*Modelo de predição USENS^{TM} baseado na OECD 442E. Abreviação NS (não sensibilizante), abreviação S (sensibilizante).

Em relação a exposição das células U937 ao NMs avaliados em diferentes concentrações (200, 175, 150, 100 e 50 µg/mL), recomendadas na diretriz OECD TG 442E os dados estão apresentados na Tabela 5. Os produtos avaliados, não apresentaram citotoxicidade nas concentrações estudadas (≤200). O mesmo ocorreu com os controles positivo (Resorcinol) e negativo (ácido lático). As células foram então expostas as concentrações de estudo, e após 45h de exposição, foi realizada a análise da expressão do marcador CD86. Os valores demonstraram que os controles apresentaram valores referentes aos estabelecidos pela a diretriz da OECD. Como foi apresentado, ocorreu um aumento no índice de estimulação para os NMs TiO_2, C60 e NTCPS concentrações com valores de EC150 183,05; 91,72; 189,48 respectivamente para cada NMs, indicando, de acordo com o modelo de predição, que estes NMs são sensibilizantes.

Tabela 5. Resultado do ensaio de estimulação do marcador CD86 baseado na OECD 442E.

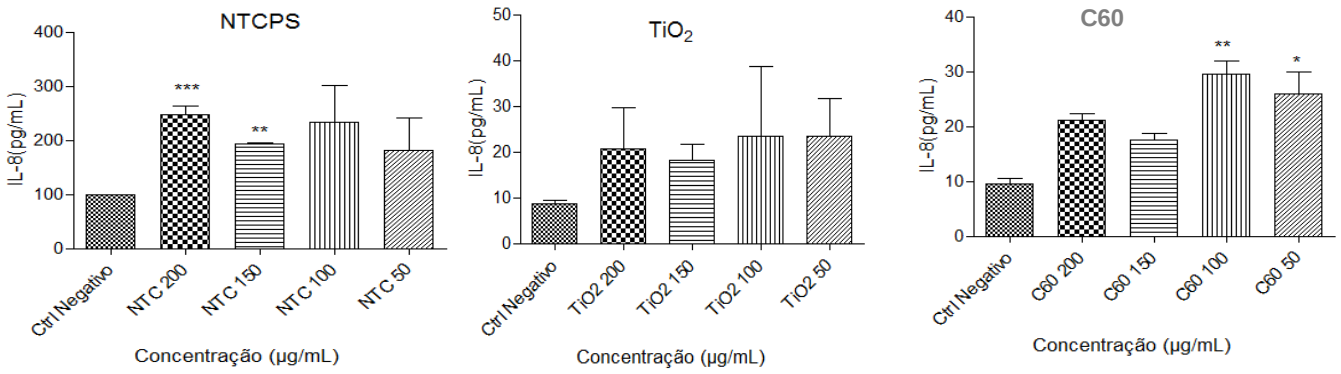
Material-teste	Solvente	Resultados U-SENS^{TM}		
		CV70 (µg/mL)	EC150 (µg/mL)	Predição*
C60	Meio	> 200	91,72	S
TiO_2	Meio	> 200	183,05	S
NTCPS	Meio	> 200	189,48	S

*Modelo de predição USENS^{TM} baseado na OECD 442E. Abreviação S (sensibilizante).

O ensaio de quantificação de citocinas inflamatórias e pró inflamatórias CBA em células U937 após 24 horas de exposição demonstrou com a comparação das células expostas aos controles negativos, o aumento na produção de interleucina-8

para os três nanomateriais (Figura 13). Porém, sendo significativo apenas para NTCPS (concentrações 200 e 150) e C60 (100 e 50).

Figura 13. Produção de IL-8 pela linhagem U937 após 24 horas de exposição à NMs. Os resultados estão expressos com média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes, realizados em duplicata (* p < 0,05; **p<0,01; *** p < 0,001quando comparado ao controle negativo).



Os NTCPS e C60 apresentaram aumento na quantificação de interleucina-8 quando comparadas ao controle de células, sendo significativo estatisticamente NTCPS nas concentrações de 200 e 150µg/mL e C60 nas concentrações de 100 e 50 150µg/mL. O TiO_2 também provocou aumento, porém, como visto no gráfico não foi considerado estatisticamente significativo.

5 DISCUSSÃO

O crescente uso de NMs tem sido observado em diferentes áreas, principalmente, nas industrias de engenharias elétrica e biomédicas, fazendo com que haja aumento na taxa de exposição humana e ambiental a estes materiais. Este fato resultou em uma eminente preocupação, com os efeitos biológicos, em especial quanto à toxicidade de NMs. Tais materiais, quando em contato direto com o ser humano e o meio ambiente, podem resultar em efeitos tóxicos necessitando de estudos obrigatórios no campo da nanotoxicologia (PIPERIGKOU et al., 2016).

Conforme mencionado anteriormente, o REACH preconiza a investigação toxicológica destes materiais e ainda sugere que a mesma seja feita com métodos não animais. Pensando nisso, o trabalho teve como objetivo avaliar se ensaios *in vitro* validados para avaliar substâncias químicas seriam capazes de avaliar nanomaterial, já que esses produtos não estão inclusos nos domínios de aplicação dos testes.

Para a realização dos ensaios *in vitro* foi necessária a caracterização dos NMs, pois a atividade biológica pode ser alterada radicalmente com a variação de algumas propriedades físico-químicas (KLAINE et al., 2008). Nesta caracterização, alguns parâmetros, tais como o tamanho médio das partículas, a área e a composição química superficial são fundamentais.

Os resultados de caracterização demonstraram homogeneidade na dispersão, obtendo valores de polidispersão para cada composto respectivamente, NTCPS (0,148), C60 (0,105) e TiO_2 (0,548). A dispersão foi realizada apenas em meio de cultura ocasionando aglomerados com diâmetros entre NTCPS (295nm), C60(322nm) e TiO_2 (220nm) o que não prejudicou os testes de internalização e sensibilização dérmica. O ensaio de internalização indicou, por meio da comparação do brilho dos NMs isoladamente e após a exposição que houve internalização de NTCPS, TiO_2 e C60 pelas células. Avaliar internalização é um importante parâmetro para a compreensão dos efeitos imunológicos desses produtos, visto que para expressar o marcador CD86 o material necessita ser internalizado por células imunológicas específicas. Mukherjee e colaboradores (2018) demonstraram que células do sistema imune são capazes de "detectar" NTCPS através de receptores específicos, sendo relevantes para o estudo do impacto destes materiais na saúde humana.

A citotoxicidade dos NMs é um importante parâmetro para se avaliar antes da execução do teste de sensibilização dérmica, como é estabelecido pela a diretriz da OECD. A avaliação da mesma foi realizada de acordo com o protocolo da OECD incluso no ensaio U-SENS onde os NMs em diferentes concentrações (200, 175, 150, 50 e 25 µg/mL) incubados com o corante iodeto de propídeo, apresentaram uma viabilidade >70 depois do período de exposição e os controles permaneceram com a viabilidade ≥ 90%. Os NMs demonstraram baixa citotoxicidade quando investigados em células do sistema imunológico, o que permitiu averiguar a alergenicidade, visto que os ensaios realizados têm como= critério utilizar concentrações não citotóxicas.

Worle-Knirsch (2006) demonstrou que os NTCPS não ocasionaram diminuição da viabilidade celular em células A549 na concentração de 50 µg/mL pelo teste de WST-1 (WÖRLE-KNIRSCH, 2006). O mesmo ocorreu quando avaliados em células de fibroblastos murinos 3T3, utilizando o teste com o corante iodeto de propídeo por citometria de fluxo (PANTAROTTO, 2004). Já células de macrófagos alveolar, após exposição das mesmas ocorridas em 9 concentrações diferentes (entre 0-226 µg/mL) foi observada citotoxicidade significativa, avaliado pelo o teste do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium (MTT) (JIA, 2005).

Efeitos semelhantes foi observado em células pulmonares A549, ECV304, NR8383 e células de queratinócitos humanos (HaCaT) em que a diminuição da viabilidade ocorreu na concentração de 0,24 mg / mL (SHVEDOVA, 2003). Cabe ressaltar que de acordo com o aumento das concentrações houve também diminuição na viabilidade celular, demonstrando que para a avaliação do potencial de sensibilização dérmica dos NTCPS não devem ser utilizadas doses >200 µg/mL).

C60 quando avaliado o mesmo parâmetro em células de macrófagos alveolar em distintas concentrações (0-226 µg/mL) demonstraram que o produto não apresentou citotoxicidade significativa (JIA, 2005). Fioroto e colaboradores (2006) demonstrou resultados semelhantes em células macrofágicas de linhagem J774 em concentrações diferentes (15-60 µg /mL), não apresentando citotoxicidade. Porém, células KEK quando expostas a diferentes concentrações do produto (0,004 a 0,4 mg/mL) sofreram diminuição significativa na viabilidade em comparação com o controle (ROUSE et a.,2006). O mesmo produto provocou também inibição do crescimento em células de linfócitos T humano na concentração de 50 µM (RANCAN, 2002).

Ao avaliar a citotoxicidade do composto TiO_2 em células de fibroblastos de camundongo (L929) em diferentes concentrações (3−600 µg/mL) pelo ensaio MTT, notou-se que a partir da concentração 60 µg / mL, houve diminuição da viabilidade celular (JIN,

Cheng-Yu et al., 2008). Já quando avaliado o mesmo parâmetro pelo teste vermelho neutro (NRU) e MTT em diferentes concentrações (0,625-10 µg/ mL), o NM revelou-se citotóxico de acordo com o aumento da concentração, onde as células expostas na concentração de 10 µg/mL apresentaram redução significativa na viabilidade.

Diversos estudos *in vitro* e in *vivo* demonstraram o comportamento desses produtos quando em contato com células do sistema imunológico, facilitando a compreensão dos efeitos desses produtos no sistema imune sendo dados relevantes para o esclarecimento do potencial alergênico. Pesquisas indicam que animais já debilitados, em contato com NMs desenvolveram processos de inflamação e agravamento de patologias (FROEHLICH, 2015). Além de desencadear reações como imunossupressão, modulação de citocinas inflamatórias e respostas imunológicas de diversas células (PALLARDY; TURBICA; BIOLA-VIDAMMENT.,2017).

Pesquisas *in vitro* realizadas por meio da exposição de células de macrófagos, demonstraram serem capazes de capturar nanopartículas de TiO_2 facilmente (MANOVOLA et al., 2008). Estudo avaliou a exposição das células macrofágicas de linhagem J774 a diferentes concentrações do C60 (15-60 µg /mL) demonstrando em contrapartida uma baixa captação do NM pelas células (FIOROTO ET AL., 2006). Warheit e colaboradores (2004) ao avaliar o mesmo comportamento de NTC em células de macrófagos, relatou que o mesmo pode escapar da depuração por macrófagos e viajar dos alvéolos para a circulação sanguínea, migrando para outros órgãos do corpo.

Devido à natureza coesiva dos NTCs esses NMs tendem a formar agregados estáveis dentro dos organismos, causando estresse inflamatório e oxidativo nos locais de sua deposição. Estes efeitos, ao longo do tempo, podem levar à destruição de tecido / órgão e aumentar o risco de câncer (JAIN; SINGH; PILLAI, 2012). Células expostas à NTC sofreram estresse oxidativo devido à indução de oxidantes e enzimas tóxicas. Sabendo que um nível mais elevado de estresse oxidativo pode levar à inflamação e citotoxicidade (JAIN; SINGH; PILLAI, 2012). Foram observados também agregados de células ligados ao NTCPS provocando consequentemente a formação de estruturas nodulares (CUI, et al. 2005). Curiosamente, estudos *in vitro* demonstraram que os NN de TiO_2, estão associados à geração de ROS em células dendriticas humanas e também promoveram a maturação das células e liberação de citocinas pró-inflamatórias (SCHANEN et al., 2013).

NMs de TiO_2 tem a capacidade de aumentar a reação de sensibilização induzida por um potente e conhecido sensibilizante dérmico, o dinitroclorobenzeno (DNCB). O teste utilizado foi uma variante do ensaio de linfonodo local chamado ensaio

de proliferação de linfonodos, que concluiu que a administração de nano-TiO_2 aumenta a potência de sensibilização dérmica do dinitroclorobenzeno (DNCB) aumentando consequentemente a resposta Th_2, comprovando habilidades imunomoduladoras dos NMs (HUSSAIN et al., 2012).

Estudos sobre a avaliação de sensibilização de pele de NM são escassos e embora estudos *in vitro* sugerem que estes materiais modulam células imunológicas bem como células dendríticas, nenhum teste foi ainda conduzido ou conclusivo. Além disso, *estudo in vitro* utilizado para avaliação dos riscos desses produtos estudam apenas a reações isoladas não o processo de sensibilização como um todo. Quando comparado aos ensaios tradicionais *in vivo*, são mais precisos para determinar alergenicidade, especialmente quando avaliados em conjunto numa estratégia de "2 out of 3".

Um estudo comparativo com métodos *in vivo* (LLNA), o mais utilizado, indica uma precisão do DPRA de 80% em discriminar não sensibilizantes (categoria 1) com uma sensibilidade de 80% e especificidade de 77% (NATSCH et al., 2013; OECD, 2015). A correlação de dados obtidos no ensaio de KeratinoSens^{TM} quando comparados com o ensaio de LLNA, apresentaram uma precisão de 77% (sensibilidade 79% e especificidade 72%) nos resultados do ensaio para um conjunto de 145 produtos químicos (EURL ECVAM, 2014). Já o ensaio U-SENS indicou quando comparados ao mesmo ensaio uma precisão na distinção de sensibilizantes da pele (ou seja, UN GHS Cat.1) de 86%, com uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 65%.

Frente a isso, nosso estudo investigou o potencial alergênico de NMs utilizando modelos *in vitro* e *in quimico* que mimetizam os eventos-chave descritos nas vias de efeito adversos (AOP) da sensibilização da pele. Os métodos presentes neste documento são validados com finalidade regulatória e /ou cientifica, utilizados para classificar substâncias sensibilizantes de pele. Cabe ressaltar que esses métodos ainda não foram avaliados quanto a sua capacidade de identificar o efeito biológicos de NMs, ou seja NM não estão incluídos no domínio de aplicação dos métodos.

Avaliando o primeiro evento-chave da sensibilização da pele por meio do ensaio mDPRA foi possível comprovar o potencial sensibilizante dos três NMs, após a avaliação da depleção peptídica, sendo os três produtos classificados dentro da categoria moderada (C60: 32,57; TiO_2: 28,05; NTCPS: 25,64), seguindo da avaliação do terceiro evento-chave que demonstrou o possível potencial alergênico dos NMs NTCPS, TiO_2 e C60 sendo IS > 150, estimulando a expressão de CD86, marcador presente nas superfícies de células dendríticas, quando em contato com um produto causador de alergenicidade.

Os estudos que indicam a capacidade destes produtos de causarem alergenicidade são escassos. Ema e colaboradores (2011) demonstrou que NTCPS e NTCPM quando testados quanto à sua toxicidade dérmica aguda e irritação ocular em porquinhos-da-índia nas concentrações máximas permitidas para administração. Os dois NM demonstraram não serem irritantes para a pele ou para os olhos. NTCPM causou eritema muito leve em 24 h, mas não em 72 h, após a remoção dos adesivos no experimento de irritação dérmica comprovou vermelhidão conjuntival e hiperemia dos vasos sanguíneos após 1 h de exposição. Porém, no experimento de irritação nos olhos após o período de 24 h não apresentaram mudança alguma. Estas descobertas mostraram que um produto NTCPM era muito fraco irritante agudo para a pele e olhos. Neste estudo nenhum dos NMs exibiu efeitos de sensibilização cutânea (EMA et al., 2011). Cabe aqui enfatizar que a capacidade preditiva deste ensaio não é a melhor maneira de avaliar atualmente sensibilização da pele, fazendo com que haja necessidade de mais informações para esclarecer o potencial de sensibilização desse NM.

Já em relação aos C60 ensaios de fototoxicidade por contato, utilizando cobaias, demonstrou que 25% do composto C60 quando aplicado e expostos a irradiação UV de comprimento de onda longo (11,2 J / cm 2) por um período de 50 minutos não revelaram qualquer potencial fototóxico, até 72 h após a radiação UV. Além disso, estes autores, utilizando os testes de irritação ocular em coelhos, observaram que estas NMs são minimamente irritantes. Estes autores realizaram ainda o “teste do patch” em humanos com “n” de 1 homens e 24 mulheres e concluíram que não apresentaram reação cutânea em 1 e 24 h após a exposição (condições oclusivas) (AOSHIMA, 2009).

NM de TiO_2 (diâmetro de 140 nm) foi avaliado por meio do ensaio do LLNA (OECD, 1992) para avaliar o potencial de sensibilização da pele. Nas condições oferecidas no estudo o TiO_2 as mesmas não produziram uma resposta de sensibilização dérmica em camundongos (WARHEIT et al., 2007). Cabe ressaltar que o estudo demonstrou apenas o 4° evento-chave da sensibilização da pele. Porém o documento de abordagens integradas IATA ressalta a importância de se avaliar pelo menos *2 out 3* testes para a confirmação do potencial não sensibilizante.

Um outro aspecto relacionado ao processo de alergenicidade é a modulação de citocinas inflamatórias. O presente trabalho avaliou a modulação de interleucinas frente a exposição de células U937 aos NMs. Resultados demonstraram aumento significativo de interleucina IL-8, um mediador importante na resposta imunológica envolvida no processo inflamatório. Estudos têm demonstrado que NMs carregados negativamente induziram a liberação de TNF-α e IL-8 pelas células THP-1, enquanto

ambas as partículas carregadas positivamente e negativamente poderiam ligar o fibrinogênio com alta afinidade (DENG, 2012). É importante ressaltar que os NMs avaliados em nosso estudo demonstraram potencial zeta negativo comprovando a tendência para expressar IL-8.

A avaliação da expressão de citocinas (IL-6, IL-8, TNF-α, IL-1β e IL-10) nas células de queratinócitos epidérmicos humanos (HEK) em diferentes concentrações (0,4 a 0,004 mg / mL) de C60 demonstraram resultados semelhantes ao do nosso estudo. Onde os NMs quando expostos na concentração de 0,04 mg / mL provocou aumento significativo de interleucina 8 ($p < 0,05$) nos períodos de tempo de 8, 12, 24 e 48h. Já as atividades de IL-6 e IL-1β foram maiores durante o período de 24 h e 48 h para distintas concentrações (0,4 e 0,04 mg / mL) (ROUSE et a.,2006).

Um estudo realizado por Schanen e colaboradores (2013), demonstrou que o TiO_2 desencadeou em células dendriticas uma resposta pró-inflamatória TH1 e uma resposta na produção de citocina IL-2 e IFN, tendo efeito imunoestimulador moderado sobre células T, demonstrando sua capacidade de induzir um aumento na população de linfócitos sobre os controles não tratado. Riedle e colaboradores (2017) apresentou um estudo sobre NM de TiO_2, quando expostos em células de macrófagos em distintas concentrações (5-100 µg / mL) provocou em concentração-dependente a secreção de IL-1β.

Outros trabalhos comprovaram a presença de várias outras citocinas envolvidas na resposta imunológica. Nanoparticulas de TiO_2, aumentou a expressão de citocinas, o que provocou a estimulação de colônias de granulócitos, interleucinas IL-1β, IL-2, IL -4 e IL-9, proteína 10 induzida pelo interferon γ, fator estimulante de colônias de macrófagos, citocinas induzidas por interferon-γ, proteína inflamatória macrofágica-1α, proteína inflamatória macrofágica-1β e proteína inflamatória macrofágica-2, seguindo do aumento do fator de necrose tumoral (AMBALAVANAN, 2012).

Estudos *in vitro* demonstraram que NTCs podem modular a produção de citocinas para Th2 (DI, M. G. et al., 2011). Após exposição pulmonar em ratos do composto NTC. Observou –se indução significativa e ativação de células Th2 e citocinas tipo 2 (DONG; MA., 2018). A avaliação *in vivo* demonstrou, após 3 semanas depois da aplicação da terceira injeção de NTCPS, ocorreu aumento significativo na produção de IL-12 e TNF-α e macrófagos no fígado, sugerindo um estado inflamatório crónico associado a uma polarização do tipo M1 (PRINCIPI et al., 2016).

C60, foi avaliado quanto ao mecanismo imunológico *in vitro* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, alterou seu efeito

na expressão de marcadores de superfície e na produção de citocinas. O NM aumentou significativamente a liberação de IL-6 e expressão de CD69 por células naturais killer. Os dados indicam que C60 não interagem com a reatividade das células T, mas podem ativar as células do sistema imune inato. Além disso, eles parecem atuar apenas em células "ingênuas", que não foram pré-estimuladas com antígenos de memória (BUNZ; PLANKENHORN; KLEIN, 2012).

Concluiu-se por meio da análise dos dados, que os modelos já validados *in vitro* e *in quimico*, utilizados nesse estudo para avaliar alergenicidade de NMs, são adequados para avaliação desses compostos, sendo comprovado o possível potencial alergênico de C60, NTCPS e TiO_2.

6 CONCLUSÃO

O trabalho permitiu concluir até o presente momento que os NMs apresentaram índice de polidispersão adequado o que permitiu visualizar homogeniedade nas amostras dispersas em meio de cultura. O resultado foi essencial para a realização dos testes de alergenicidade e internalização. Em relação ao ensaio de internalização celular foi possível concluir por meio da comparação do brilho do NM isoladamente e depois da exposição das células, a presença dos compostos em seu interior.

Os estudos de sensibilização da pele, por meio dos ensaios de mDPRA e U-SENS^{TM} demonstraram ser capazes de categorizar o potencial de alergenicidade de NTC, TiO_2 e C60, uma vez que ao avaliar o primeiro evento-chave da sensibilização da pele por meio do ensaio mDPRA foi possível concluir o potencial sensibilizante dos NMs categorizados como positivos sensibilizantes incluídos na classe moderada, atendendo todos os critérios do teste.

Sobre a avaliação do terceiro evento-chave investigou-se o potencial de NMs de modular a expressão do marcador CD86 utilizando a metodologia U-SENS^{TM}. Os ensaios concluíram que C60, dióxido de titânio e NTCPS foram positivos para sensibilização dérmica com o IS>150. Conforme apresentado, os modelos *in vitro* e *in chemico* validados internacionalmente e harmonizados demonstraram ser capazes de avaliar alergenicidade de NMs compostos de carbono (NTCPS e C60) e óxido natural (titânio).

Em relação aos estudos de quantificação de interleucinas, o ensaio demonstrou o aumento significativo na quantificação de IL-8 para NTCPS e C60. Os resultados dos estudos comprovam que esses NMs quando ultrapassam a barreira da pele passando do meio externo para o interno do corpo humano podem causar processos inflamatórios relacionados ao mecanismo da dermatite de contato alérgica.

6 REFERÊNCIAS

AHN, Ilyoung et al. Performance standard-based validation study for local lymph node assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 183-194, 2016.

AITKEN, Rob J. Et al. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational medicine**, v. 56, n. 5, p. 300-306, 2006.

AKDIS, Mübeccel et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 127, n. 3, p. 701-721. e70, 2011.

ALÉPÉE, N. et al. Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 373-382, 2015.

AMBALAVANAN, Namasivayam et al. Titanium oxide nanoparticle instillation induces inflammation and inhibits lung development in mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 304, n. 3, p. L152-L161, 2012.

ANDERSON, Stacey E.; SIEGEL, Paul D.; MEADE, B. J. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. **Journal of allergy**, v. 2011, 2011.

AOSHIMA, Hisae et al. Safety evaluation of highly purified fullerenes (HPFs): based on screening of eye and skin damage. **The Journal of toxicological sciences**, v. 34, n. 5, p. 555-562, 2009.

ARANGO DUQUE, Guillermo; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 2014.

ASHIKAGA, Takao et al. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 38, n. 4, p. 275-284, 2010.

BAKER, Gregory L. et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. **Toxicological sciences**, v. 101, n. 1, p. 122-131, 2007.

BANGA, Amiraj et al. Functional effects of nanoparticle exposure on Calu-3 airway epithelial cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, n. 1-2, p. 197-212, 2012.

BASKETTER, David et al. Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 90-96, 2009.

BATISTA-DUHARTE, Alexander; LINDBLAD, Erik B.; OVIEDO-ORTA, Ernesto. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. **Toxicology letters**, v. 203, n. 2, p. 97-105, 2011.

BAUCH, Caroline et al. Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 489-504, 2012.

BEST, Andrew; KAMILAR, Jason M. The evolution of eccrine sweat glands in human and nonhuman primates. **Journal of human evolution**, v. 117, p. 33-43, 2018.

BfR, Instituto Federal de Avaliação de Riscos (BfR) https://www.bfr.bund.de/en/zebet___alternative_methods_to_animal_experiments-53868.html . 2018.

BIANCO, Alberto; KOSTARELOS, Kostas; PRATO, Maurizio. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 6, p. 674-679, 2005.

BORM, Paul JA et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle and fibre toxicology, v. 3, n. 1, p. 11, 2006.

BOSSHARD, E. Review on skin and mucous-membrane irritation tests and their application. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1985.

BUEHLER, E. V. A rationale for the selection of occlusion to induce and elicit delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. In: **Contact Allergy Predictive Tests in Guinea Pigs**. Karger Publishers, 1985. p. 39-58.

BUEHLER, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. **Archives of Dermatology**, v. 91, n. 2, p. 171-175, 1965.

BUNZ, Hanno; PLANKENHORN, Sandra; KLEIN, Reinhild. Effect of buckminsterfullerenes on cells of the innate and adaptive immune system: an in vitro study with human peripheral blood mononuclear cells. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 4571, 2012.

CARD, Jeffrey W.; MAGNUSON, Bernadene A. A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. **International journal of toxicology**, v. 29, n. 4, p. 402-410, 2010.

CHARLES, Sandrine et al. Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO2 nanoparticles in a regulatory context. **Nanotoxicology**, v. 12, n. 4, p. 357-374, 2018.

CHENG, Jinping; FLAHAUT, Emmanuel; CHENG, Shuk Han. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (Danio rerio) embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 708-716, 2007.

CHO, Eun Chul; ZHANG, Qiang; XIA, Younan. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. **Nature nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 385, 2011.

COREY, Sarah M. et al. Sensory innervation of the nonspecialized connective tissues in the low back of the rat. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 6, p. 521-530, 2011.

COSTA-AMARAL, Isabele C. et al. Environmental Assessment and Evaluation of Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarkers Related to Chronic Occupational Exposure to Benzene. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 12, p. 2240, 2019.

CROUCH, S. P. M. et al. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. **Journal of immunological methods**, v. 160, n. 1, p. 81-88, 1993.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUI, Daxiang et al. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. **Toxicology letters**, v. 155, n. 1, p. 73-85, 2005.

DE AVILA, Renato Ivan et al. In vitro assessment of skin sensitization, photosensitization and phototoxicity potential of commercial glyphosate-containing formulations. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 386-392, 2017.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DENG, Zhou J. et al. Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 3, p. 314-322, 2012.

DEXTER, Sarah J. et al. Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

DI, M. Gioacchino et al. Immunotoxicity of nanoparticles. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 65S-71S, 2011.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; HOLTZCLAW, W. David; KENSLER, Thomas W. The role of Keap1 in cellular protective responses. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 12, p. 1779-1791, 2005.

DOAK, S. H. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1, p. 104-111, 2012.

DOBROVOLSKAIA, Marina A.; GERMOLEC, Dori R.; WEAVER, James L. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 7, p. 411, 2009.

DOBROVOLSKAIA, Marina A.; SHURIN, Michael; SHVEDOVA, Anna A. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. Toxicology and applied pharmacology, v. 299, p. 78-89, 2016.

DONCHEVSKAYA, Elena. **REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)**. 2009. Tese de Doutorado. Видавництво СумДУ.

DONG, Jie; MA, Qiang. Type 2 Immune Mechanisms in Carbon Nanotube-Induced Lung Fibrosis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1120, 2018.

DRAIZE, J.H. (1959). Dermal toxicity. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. The Assoc. of Food and Drug Officials of the United States. Texas State Dept. of Health, Austin, TX, p. 46

EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl- ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat- for-skin-sensitisation-testing

EHLING, G. et al. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 2nd round. **Toxicology**, v. 212, n. 1, p. 69-79, 2005.

ELSABAHY, Mahmoud; WOOLEY, Karen L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 5552-5576, 2013.

EMA, Makoto et al. Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 276-281, 2011.

Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

ENGIN, Ayse Basak et al. Mechanistic understanding of nanoparticles' interactions with extracellular matrix: the cell and immune system. **Particle and fibre toxicology**, v. 14, n. 1, p. 22, 2017.

FOSS HANSEN, Steffen et al. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 3, p. 243-250, 2007.

FROEHLICH, Eleonore. Value of phagocyte function screening for immunotoxicity of nanoparticles in vivo. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 3761, 2015.

GALBIATI, Valentina et al. In vitro assessment of silver nanoparticles immunotoxicity. Food and Chemical Toxicology, v. 112, p. 363-374, 2018.

GERBERICK, G. Frank et al. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. Methods, v. 41, n. 1, p. 54-60, 2007.)

GERBERICK, G. Frank et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 417-427, 2007.

GHAFARI, Parnian et al. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 6, p. 347, 2008.

GOODARZI, Saba et al. Fullerene: Biomedical engineers get to revisit an old friend. **Materials Today**, v. 20, n. 8, p. 460-480, 2017.

GU, Ning et al. Effects of oral administration of titanium dioxide fine-sized particles on plasma glucose in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 124-131, 2015.

GUIDANCE, Draft. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. 2011.

HARTMANN, Nanna B. et al. NanoCRED: A transparent framework to assess the regulatory adequacy of ecotoxicity data for nanomaterials–Relevance and reliability revisited. **NanoImpact**, v. 6, p. 81-89, 2017.

HENNINO, Ana et al. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetoras e das células T CD4 regulatórias Update on the pathophysiology with special emphasis on CD8 effector T cells and CD4 regulatory T cells. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 335-47, 2005.

HOPPSTÄDTER, Jessica et al. M2 polarization enhances silica nanoparticle uptake by macrophages. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 55, 2015.

HUCZKO A, BYSZEWSKI P. Fullerines 1. Characteristics of Production Techniques. Fullerines Carbon Nanotubes, vol. 5. Wrocław, Poland: Wiadomości Chemiczne, 1998

ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10- 7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

ISHIZAKA, Akihito; TONO-OKA, Tatsuhito; MATSUMOTO, Shuzo. Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. **Journal of immunological methods**, v. 72, n. 1, p. 127-132, 1984.

ISO/TS 80004-1:2010, Nanotechnology – Vocabulary – Part 1: Core Terms. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland,

2010; https://www.iso.org/standard/51240.html (accessed July 17, 2017). Return to citation in text: [1]

IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Gehong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 1, 2012.

JAIN, Sapna; SINGH, Shree R.; PILLAI, Shreekumar. Toxicity issues related to biomedical applications of carbon nanotubes. **J Nanomed Nanotechol**, v. 3, n. 140, p. 2, 2012.

JATANA, Samreen; DELOUISE, Lisa A. Understanding engineered nanomaterial skin interactions and the modulatory effects of ultraviolet radiation skin exposure. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 1, p. 61-79, 2014.

JEEVANANDAM, Jaison et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.

JIA, Guang et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 5, p. 1378-1383, 2005.

JIN, Cheng-Yu et al. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1871-1877, 2008.

KANG, Seoktae; MAUTER, Meagan S.; ELIMELECH, Menachem. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 7, p. 2648-2653, 2009.

KANSANEN, Emilia et al. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 45-49, 2013.

KAPRALOV, Alexander A. et al. Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung upon pharyngeal aspiration. **ACS nano**, v. 6, n. 5, p. 4147-4156, 2012.

KIMBER, I.; HILTON, J.; BOTHAM, P. A. Identification of contact allergens using the murine local lymph node assay: comparisons with the Buehler occluded patch test in guinea pigs. **Journal of Applied Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 173-180, 1990.

KIMBER, Ian; DEARMAN, Rebecca J. The local lymph node assay and skin sensitization testing. In: Immunotoxicity Testing. Humana Press, 2010. p. 221-231.

KISHIMOTO, Tadamitsu et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1243-1254, 1995.

KLAINE, Stephen J. et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1825-1851, 2008.

KOSTNER et al. Allergic contact dermatitis. Immunology and Allergy Clinics of North America, 37(1):141-152. 2017.

KREILING, Reinhard et al. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig

maximization test (GPMT). **Food and Chemical toxicology**, v. 46, n. 6, p. 1896-1904, 2008.

KREYLING, Wolfgang G.; SEMMLER-BEHNKE, Manuela; CHAUDHRY, Qasim. A complementary definition of nanomaterial. **Nano today**, v. 5, n. 3, p. 165-168, 2010.

KUHN, Dagmar A. et al. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 5, p. 1625, 2014.

KUPPER, Thomas S.; FUHLBRIGGE, Robert C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 211, 2004.

LACERDA, Lara et al. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. Advanced drug delivery reviews, v. 58, n. 14, p. 1460-1470, 2006.

LAM, Chiu-Wing et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. **Toxicological sciences**, v. 77, n. 1, p. 126-134, 2004.

LEHMANN, David M. Use of the LLNA: BrdU-ELISA for Skin Sensitization Hazard Assessment. In: **Immunotoxicity Testing**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 101-116.

LINSLEY, Peter S. et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v. 1, n. 9, p. 793-801, 1994.

LIU, Qihai et al. The applications of buckminsterfullerene C60 and derivatives in orthopaedic research. **Connective tissue research**, v. 55, n. 2, p. 71-79, 2014.

LUANPITPONG, Sudjit; WANG, Liying; ROJANASAKUL, Yon. The effects of carbon nanotubes on lung and dermal cellular behaviors. **Nanomedicine**, v. 9, n. 6, p. 895-912, 2014.

MACOVEZ, Roberto. Physical properties of organic fullerene cocrystals. **Frontiers in Materials**, v. 4, p. 46, 2018.

MADANI, Seyed Yazdan; MANDEL, Abraham; SEIFALIAN, Alexander M. A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano reviews, v. 4, n. 1, p. 21521, 2013.

MANNERSTRÖM, Marika et al. The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes. Toxicology in Vitro, v. 37, p. 113-120, 2016.MANOLOVA, Vania et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. European journal of immunology, v. 38, n. 5, p. 1404-1413, 2008.

MANOLOVA, Vania et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European journal of immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404-1413, 2008.

MARTINS, Luis Eduardo Agner Machado; REIS, Vitor Manoel Silva dos. Immunopathology of allergic contact dermatitis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 419-433, 2011.

MATIJA, Lidija et al. Fullerene based nanomaterials for biomedical applications: engineering, functionalization and characterization. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications, 2013. p. 224-238.

MCGARRY, Helen F. The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. **Toxicology**, v. 238, n. 2-3, p. 71-89, 2007.

MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and organization of human skin. **Rook's textbook of dermatology**, v. 3, p. 1-15, 2004.

MESCHER, Anthony L. **Junqueira's basic histology: text and atlas**. Mcgraw-hill, 2013.

MIAO, Xiaoyuan; LENG, Xiangfeng; ZHANG, Qiu. The current state of nanoparticle-induced macrophage polarization and reprogramming research. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 336, 2017.

Ministério **da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações**

MONIE. T.; 1st Edition. A Compositional and Functional Perspective. Write a review. **eBook ISBN:** 9780081007587. **Paperback ISBN:** 9780128044643 **Imprint:** Academic Press. **Published Date:** 20th February 2017.

MONTAGNA, William. **The structure and function of skin**. Elsevier, 2012.

MUKHERJEE, Sourav P. et al. Macrophage sensing of single-walled carbon nanotubes via Toll-like receptors. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1115, 2018.

MURRAY, A. R. et al. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of z et al.The intra- and interlaboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. In Vitro 25, 733-744. (2011).

NATSCH, Andreas et al. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1337-1352, 2013.

NEPAL, Mahesh Raj et al. A simple in chemico method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules. **Toxicology letters**, v. 289, p. 75-85, 2018.

NG, Keng Wooi; LAU, Wing Man. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In: **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 3-11.

NIH: National Institute of Environmental Health Sciences. Nanomaterials. 2016. Available online: **http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/**

NOLASCO, Loreci Gottschalk et al. Regulamentação jurídica da nanotecnologia. 2016.

OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines NO, OECD Test. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. 2010.

OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

OECD (2010), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

OECD (2010), *Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris,https://doi.org/10.1787/9789264090996-en.

OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: htm]. [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.

OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass]

OECD (2018). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

OECD Guideline for testing of chemicals. Guideline 406: Skin Sensitisation. OECD, Adopted 12 May 1981, updated 17th July 1992.

OECD, 2010. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A. OECD, Paris, France

OECD. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Publishing; 2015.

PALLARDY, Marc J.; TURBICA, Isabelle; BIOLA-VIDAMMENT, Armelle. Why the immune system should be concerned by nanomaterials?. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 544, 2017.

PANTAROTTO, Davide et al. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. **Chemical communications**, n. 1, p. 16-17, 2004.

PATZELT, Alexa et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of controlled release**, v. 150, n. 1, p. 45-48, 2011.

PIPERIGKOU, Zoi et al. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. **Food and chemical toxicology**, v. 91, p. 42-57, 2016.

PIROIRD, Cécile et al. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. **Toxicology in vitro**, v. 29, n. 5, p. 901-916, 2015.

POLAND, Craig A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 7, p. 423, 2008.

POLAND, Craig A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 7, p. 423, 2008.

POWERS, Kevin W. et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 296-303, 2006.

PRINCIPI, Elisa et al. Systemic distribution of single-walled carbon nanotubes in a novel model: alteration of biochemical parameters, metabolic functions, liver accumulation, and inflammation in vivo. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 4299, 2016.

RANCAN, Fiorenza et al. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C60 mono-adduct and a malonic acid C60 tris-adduct on Jurkat cells. **Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, n. 3, p. 157-162, 2002.

RAUSCHER, Hubert; RASMUSSEN, Kirsten; SOKULL-KLÜTTGEN, Birgit. Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 89, n. 3, p. 224-231, 2017.

REISINGER, Kerstin et al. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 259-270, 2015.

RIEDLE, Sebastian et al. Pro-inflammatory adjuvant properties of pigment-grade titanium dioxide particles are augmented by a genotype that potentiates interleukin 1β processing. **Particle and fibre toxicology**, v. 14, n. 1, p. 51, 2017.

ROBINSON, M. K. et al. A risk assessment process for allergic contact sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 479-489, 1989.

ROBINSON, Michael K. et al. A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization. **Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 91-107, 1990.

ROUSE, Jillian G. et al. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 8, p. 1313-1320, 2006.

SAATHOFF, J. G. et al. In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2105-2112, 2011.

SAHAY, Gaurav; ALAKHOVA, Daria Y.; KABANOV, Alexander V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of controlled release**, v. 145, n. 3, p. 182-195, 2010.

SAITO, Riichiro; DRESSELHAUS, Gene; DRESSELHAUS, Mildred S. **Physical properties of carbon nanotubes**. 1998.

SAQUIB, Quaiser et al. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicology in vitro**, v. 26, n. 2, p. 351-361, 2012.

SCHANEN, Brian C. et al. Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO2 and TiO2 nanoparticles. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62816, 2013.

SEKIZAWA, Jun et al. A simple method for screening assessment of skin and eye irritation. **The journal of Toxicological sciences**, v. 19, n. 1, p. 25-35, 1994.

SENSITISATION, In Chemico Skin. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. 2015.

SENSITISATION, In Chemico Skin. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. 2015.

SHANNAHAN, Jonathan H.; BROWN, Jared M. Engineered nanomaterial exposure and the risk of allergic disease. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 14, n. 2, p. 95, 2014.

SHI KAM, Nadine Wong et al. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube− protein conjugates into mammalian cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 22, p. 6850-6851, 2004.

SHVEDOVA, Anna A. et al. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 221, n. 3, p. 339-348, 2007.

SHVEDOVA, Anna et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. **Journal of toxicology and environmental health Part A**, v. 66, n. 20, p. 1909-1926, 2003

Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TGG, Wright CJ, Doak SH. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomater 2009; 30: 3891-3914

Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. Nat Rev Immunol 2013; 13:592–605

SMULDERS, Stijn et al. Nano-TiO2 modulates the dermal sensitization potency of dinitrochlorobenzene after topical exposure. **British Journal of Dermatology**, v. 172, n. 2, p. 392-399, 2015.

SONTHEIMER, Richard D. Skin is not the largest organ. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 2, p. 581, 2014.

TAKENOUCHI, Osamu et al. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1318-1332, 2015.

TARAFDAR, J. C.; SHARMA, Shikha; RALIYA, Ramesh. Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, 2013.

TAYLOR, Alison et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-β: the role of T regulatory cells. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 433-442, 2006.

THOMAS, D. W. et al. Inflammatory cell infiltrate associated with primary and transplanted tumours in an inbred model of oral carcinogenesis. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 24, n. 1, p. 23-31, 1995.

TKACH, Alexey V. et al. Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure. **ACS nano**, v. 5, n. 7, p. 5755-5762, 2011.

TKACH, Alexey V. et al. Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure. **ACS nano**, v. 5, n. 7, p. 5755-5762, 2011.

TONG, Haiyan et al. Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 239, n. 3, p. 224-232, 2009.

TOTSUKA, Yukari et al. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. **Particle and fibre toxicology**, v. 6, n. 1, p. 23, 2009.

TROJANOWICZ, Marek. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **TrAC trends in analytical chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, 2006.

United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

UO, Motohiro et al. Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials. **Dental materials journal**, v. 30, n. 3, p. 245-263, 2011

USENKO, Crystal Y.; HARPER, Stacey L.; TANGUAY, Robert L. In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. **Carbon**, v. 45, n. 9, p. 1891-1898, 2007.

WANG, Ruhung et al. Cytotoxicity screening of single-walled carbon nanotubes: detection and removal of cytotoxic contaminants from carboxylated carbon nanotubes. **Molecular pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1351-1361, 2011.

WANG, Tiantian et al. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. ACS nano, v. 6, n. 2, p. 1251-1259, 2012.

WARHEIT, David B. et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. **Toxicological sciences**, v. 77, n. 1, p. 117-125, 2004.

WARHEIT, David B. et al. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO2 particles as a component of nanoparticle risk management. **Toxicology letters**, v. 171, n. 3, p. 99-110, 2007.

WARHEIT, David B. et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. **Toxicological sciences**, v. 91, n. 1, p. 227-236, 2006.

WÖRLE-KNIRSCH, J. M.; PULSKAMP, K.; KRUG, H. F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. **Nano letters**, v. 6, n. 6, p. 1261-1268, 2006.

YADAV, Jyoti. Fullerene: Properties, Synthesis and Application. **Research & Reviews: Journal of Physics**, v. 6, n. 3, p. 1-6, 2018.

YAMASHITA, Kunihiko et al. Development of LLNA: DAE: a new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing. **The Journal of toxicological sciences**, v. 39, n. 1, p. 147-161, 2014.

YAMASHITA, Kunihiko et al. Unsaturated fatty acids show clear elicitation responses in a modified local lymph node assay with an elicitation phase, and test positive in the direct peptide reactivity assay. **The Journal of toxicological sciences**, v. 40, n. 6, p. 843-853, 2015.

YANG, Sheng-Tao et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. **Toxicology letters**, v. 181, n. 3, p. 182-189, 2008.

YANG, Wenrong et al. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 18, n. 41, p. 412001, 2007.

YAZDI, Amir S. et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1α and IL-1β. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201008155, 2010.

YOSHIOKA, Yasuo et al. Allergic responses induced by the immunomodulatory effects of nanomaterials upon skin exposure. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 169, 2017.

ZHU, Rongrong et al. The induction of maturation on dendritic cells by TiO2 and Fe3O4@ TiO2 nanoparticles via NF-κB signaling pathway. **Materials Science and Engineering: C**, v. 39, p. 305-314, 2014.

ZHU, Xiaoshan et al. Developmental toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 26, n. 5, p. 976-979, 200