

Setembro 2017

Diana Patrícia Lopes dos Santos

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cellular and Molecular Toxicity of Nanoparticles: A laboratorial approach” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Laura Maria dos Santos Coelho, da Dra. Vanessa Fachada de Oliveira e da Professora Doutora Eliana Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa adaptado de: “Nanoteknoloji Kullanım Alanları” [Acedido 5 de Set. 2017]. Disponível em <URL: <https://i2.wp.com/www.fizikmuh.com/wp-content/uploads/2016/12/nanoteknoloji-kullanim-alanlari.jpg?fit=768%2C512>>.

Diana Patrícia Lopes dos Santos

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cellular and Molecular Toxicity of Nanoparticles: A laboratorial approach” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Laura Maria dos Santos Coelho, da Dra. Vanessa Fachada de Oliveira e da Professora Doutora Eliana Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Patrícia Lopes dos Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012137769 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles: A laboratorial approach” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 13 de setembro de 2017,

Diana Patrícia Lopes Santos

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por todos os ensinamentos e oportunidades, que nos últimos 5 anos me proporcionaram um percurso académico ímpar.

Ao meus pais e restante minha família, por terem sido sempre o suporte e a base para realização deste sonho.

À minha orientadora, Professora Doutora Eliana Souto, pelo acompanhamento, cooperação e disponibilidade que me ajudaram à elaboração desta monografia.

À Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica Lda., na pessoa da Doutora Vanessa Fachada, pela oportunidade, e por toda simpatia e disponibilidade demonstrada.

À Equipa da Farmácia do Forum pela oportunidade de realização do estágio, por todo o companheirismo, disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos ao longo do estágio.

Agradeço também aos meus colegas e amigos, com quem partilhei a vida académica.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Índice

Parte I | Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de siglas e abreviaturas	7
1 – INTRODUÇÃO	8
2 – ANALISE SWOT	9
2.1 – Tabela Resumo	9
2.2 - Pontos Fortes.....	9
2.3 - Pontos Fracos	13
2.4 - Oportunidades.....	14
2.5 - Ameaças	18
3 – CASOS PRÁTICOS	18
3.1 - Caso 1- Onicomicose	18
3.2 - Caso 2- Obstipação.....	19
3.3 - Caso 3- Inflamação da garganta.....	19
4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
Anexo 1 – Preparação do Trimetoprim.....	20
Anexo 2 – Preparação de Solução de ácido bórico à saturação	22

Parte II | Relatório de estágio curricular : Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda.

Lista de siglas e abreviaturas	25
1 – INTRODUÇÃO	27
2 – FARMACOVIGILÂNCIA	27
3 – ANALISE SWOT	28
3.1 - Tabela Resumo.....	28
3.2 - Pontos Fortes:.....	28
3.3 - Pontos Fracos:	32
3.4 - Oportunidades:.....	32
3.5 - Ameaças:	33
4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

Part III | Monographic: “Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles: A laboratorial approach”

RESUMO	35
ABSTRACT	36
List of abbreviations and acronyms	37
1 – INTRODUCTION.....	39
2 – NANOTOXICOLOGY.....	40
2.1 - Exposure route and Distribution.....	40
2.2 - Cellular NP interactions.....	41
2.3 - NPs’ characteristics	48
2.4 - Microenvironment-NP interactions	50
2.5- NPs Characterization	52
3 – NANOTOXICITY ASSESSMENT	55
3.1 - In Vitro methods	55
3.2 - In Vitro Assays.....	60
3.3 - In Vivo methods	62
4 – BIOINFORMATICS.....	68
4.1 - Sedimentation, Diffusion and in vitro Dosimetry model	66
4.2 - Quantitative Structure-Activity Relationship models.....	66
5 – CHALLENGES AND CONCLUSIONS	66
6 – BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.	68
Annex 1 – Methods for cell-Nanoparticle Analysis.....	74
Annex 2 – Examples of In vitro/In vivo studies on toxicity of NPs	75
Annex 3 – Cell-On-a-Chip representations	76
Annex 4 – Organ-On-a-Chip representations	77
Annex 5 – Representation of a 3D-Culture microtissue model.....	78

Parte I
Relatório de Estágio
em Farmácia Comunitária

Lista de siglas e abreviaturas

DCI	Denominação Comum Internacional
FC	Farmácia comunitária
MCIF	Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas
MM	Medicamentos Manipulados
MNRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Medica
PA	Pressão Arterial
PVP	Preço de venda ao público
SWOT	Do inglês, Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças

I- INTRODUÇÃO

A Farmácia comunitária (FC) destaca-se pela sua proximidade com os cidadãos fornecendo soluções de saúde e bem-estar, apresentadas por um profissional competente e qualificado, o Farmacêutico ^[1]. Assim, representa um espaço de prestação de cuidados de saúde de elevado conhecimento técnico-científico, onde ao Farmacêutico, como profissional de saúde dotado de uma grande variedade de conhecimentos, são incumbidas as funções de gerência e dispensa de medicamentos, preparação de medicamentos manipulados e o seguimento farmacoterapêutico, com a finalidade de garantir a sua eficiência e a segurança.

Inserido no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), a unidade curricular Estágio é realizada no 2º semestre do quinto ano tendo como obrigatoriedade a realização do estágio em FC. Este tem como objetivo consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso fazendo a interface entre teoria e a prática, pretendendo que os alunos acrescentem novos saberes e competências mais direcionadas para a prática real/profissional, tornando-os pessoas pró-ativas e profissionais com papel importante na sociedade.

O presente relatório diz respeito ao meu estágio na Farmácia do Forum que se realizou entre os dias 3 de abril de 2017 e o dia 20 de julho de 2017, sob a orientação da Dra. Laura Coelho, diretora-técnica da farmácia. Neste documento irei avaliar e detalhar a minha experiência enquanto estagiária, referindo as atividades realizadas e a competências adquiridas refletindo sobre o desempenho das mesmas sob análise das forças, oportunidades, fraquezas e ameaças (SWOT) do estágio. Concedo, ainda uma breve descrição de casos práticos de forma a materializar algumas das vivências ocorridas durante o estágio.

2- ANÁLISE SWOT

2.1 - Tabela Resumo

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">- Equipa da Farmácia;- Diversidade de tarefas realizadas;- Localização da Farmácia;- Farmácia focada no Utente;- Autonomia e responsabilidade.	<ul style="list-style-type: none">- Insegurança e receio inicial;- Dificuldade em associar nome de marca aos princípios ativos;- Prescrição por DCI;- Receitas manuais;- Muitos utentes não habituais.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">-Autonomia;-Formações das marcas e dos laboratórios;- Aconselhamento dermocosmético;- Farmácia: Localização equipa e equipamentos.	<ul style="list-style-type: none">- Imagem do estagiário para os utentes;- Rapidez no Atendimento.

2.2 - Pontos Fortes:

I. Equipa da Farmácia

A Farmácia do Forum é provida de uma equipa de 15 profissionais jovens, dinâmicos dotados de grande conhecimento científico que, desde o primeiro momento, mostraram disponibilidade, simpatia e espírito de ajuda facilitando o meu trabalho enquanto estagiária.

A coordenação e cooperação que se vive entre todos os elementos tornou evidente a dinâmica de trabalho contribuindo para aligeirar a minha integração na equipa.

Inicialmente, a equipa forneceu-me todas as ferramentas e conhecimentos necessários para o desenrolar das tarefas sendo que, após algumas semanas, já me encontrava a desempenhá-las com autonomia. Uma autonomia controlada uma vez que, sempre que surgia um caso novo todos os colegas se demonstravam compreensivos e auxiliavam na melhor resolução do mesmo. Sendo que, a ajuda prestada por qualquer membro, tinha também uma finalidade educativa, pois não era dada simplesmente a solução, esta era discutida comigo,

contribuindo assim para que pudesse adquirir os conhecimentos/ferramentas necessárias à futura resolução independente de casos semelhantes.

Resumidamente, considero a equipa da farmácia um ponto forte no meu estágio porque me proporcionou a realização de todas as tarefas de forma segura e competente, participando ativamente no meu crescimento, tanto profissional, como pessoal.

II. Diversidade de tarefas realizadas

O meu estágio compreendeu várias fases, que foram postas em prática de forma sequencial, levando a que passasse por todas as áreas da farmácia. Para além do conhecido atendimento, de tão nobre responsabilidade, também realizei atividades no BackOffice que, nada ficam atrás do atendimento aos utentes, visto que carecem também de atenção e competência.

Embora todas as atividades tenham contribuído para o enriquecimento e munição de novos conhecimentos e ferramentas, destaco as seguintes:

- A receção de encomendas foi a tarefa com a qual iniciei o meu estágio. Foi importante pois proporcionou-me a familiarização com o SIFARMA2000® e possibilitou a averiguação dos medicamentos com maior rotatividade na farmácia. A execução desta função compreende a atenção ao número de unidades de cada produto que é recebido, o seu prazo de validade, o preço a que é faturado, o preço a que será vendido (sendo que este poderá ter de sofrer alterações tendo em conta o preço anterior) e a margem de lucro habitual da farmácia.

No decorrer desta função, tive um contacto direto com o medicamento, o que me ofereceu a possibilidade de verificar os nomes comerciais de certos princípios ativos, o grupo homogéneo, as cores típicas das embalagens de alguns laboratórios, bem como a sua localização na farmácia. Esta atividade veio facilitar o meu desempenho no atendimento.

- A conferência do receituário, na qual a minha função consistiu apenas na separação e ordenação do receituário por organismos e lotes e o seu posterior envolvimento com verbete previamente impresso. É de referir que as receitas manuais estariam previamente conferidas. Ao realizar esta tarefa tive o primeiro contacto com os dois dos três tipos diferentes de receitas: receita manual e a eletrónica materializada (permite que seja feita por via eletrónica ou manual), bem como os diversos organismos e sistemas complementares de participações e especificidades de cada um, o que me dotou de competência para a dispensa deste tipo de receitas.

- O controlo validades que é de uma importância peculiar e que, por isso mesmo, é realizado uma vez por mês, consistindo na emissão, pelo programa do SIFARMA2000®, de uma listagem onde constam os medicamentos e produtos que findam a validade nos três meses

seguintes. Com esta lista, tem de proceder-se à recolha dos medicamentos e produtos nela mencionados, verificando a verdadeira validade dos mesmos. Deve ter-se muita atenção visto que alguns podem ter a validade mal inserida no programa o que dificulta a tarefa e pode por em causa o próprio medicamento e, conseqüente eficácia e segurança aquando da sua administração. No caso de a validade ser mais próxima deve ser avaliada a possibilidade de venda sendo que, caso se verifique necessário, terão de ser enviados para o armazém. Esta atividade também proporciona a confirmação dos stocks existentes.

- Os serviços de medição de pressão arterial (PA), frequência cardíaca e parâmetros bioquímicos (colesterol total, glicemia em jejum e pós-prandial) foram muitas vezes por mim realizados no decorrer do estágio. Estes serviços ao utente permitiram-me (i) aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos durante o MICEF; (ii) melhorar a prática na realização das medições através do contacto com os diversos aparelhos de medição; (iii) e o contacto direto com o utente, pois com estes eram analisados os resultados, procurando não só identificar causas para os valores adquiridos, como também apelar a medidas não farmacológicas para controlo das patologias. Nos casos mais graves, o conselho foi o de visitar o médico, para que fosse feita uma avaliação mais cuidada e rigorosa.

- A realização de manipulados. A Farmácia do Forum detém todo o material necessário, bem como as instalações necessárias à realização de manipulados, possuindo matérias primas, formulários e procedimentos de execução. Assim, no decorrer do meu estágio pude fazer alguns medicamentos manipulados (MM). MM são, segundo o anexo da Portaria n.º 594/2004 de 2 de junho, “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” [2].

A sua utilização prende-se com o facto de não haver soluções no mercado tão específicas e adaptadas, estando sobretudo relacionada com preparações de uso dermatológico e pediátrico.

Dos manipulados realizados destaco o trimetropim a 1%, para uso pediátrico, uma pomada de mistura de vários agentes queratolíticos, para tratamento de uma dermatose, e uma solução de ácido boricado à saturação para uso auricular.

A execução dos manipulados foi facilitada pela existência de procedimentos bem descritos e organizados, bem como pela orientação da Dr.ª Filipa Guerra que me possibilitou adquirir todos os conhecimentos necessários. Após a realização dos MM é necessário proceder ao preenchimento da ficha de preparação, que inclui a descrição das matérias primas, do procedimento, das condições de acondicionamento bem como o cálculo do preço de venda ao público (PVP). Em anexo (anexo 1 e 2) encontram-se dois exemplos desta ficha de preparação realizados durante o estágio e a respetiva receita e rótulo.

A realização desta atividade foi importante porque, para além de me permitir lidar com algumas matérias-primas e relembrar técnicas de manipulação, o cálculo do PVP possibilitou consolidar conhecimentos adquiridos.

Embora sejam cada vez menos utilizados é uma mais valia saber como se procede em caso de realização de MMs.

III. Localização da farmácia

A Farmácia do Forum situa-se no Forum Coimbra, sendo por isso uma farmácia muito concorrida por diversas pessoas, dando assim a possibilidade de contacto com vários públicos. Considera-se que a população utente desta farmácia é heterogénea compreendendo várias faixas etárias, não havendo um público alvo específico. Este facto foi importante para a minha formação pois permitiu-me ter contacto com pessoas de diferentes idades, classes sociais e níveis de formação que padecem de necessidades e exigências diferentes e diversas, que me possibilitaram assim ao contacto com um distinto leque de medicamentos e produtos farmacêuticos, contribuindo desta forma para o aumento da minha bagagem enquanto farmacêutica.

IV. Farmácia focada no utente

A Farmácia do Forum é focada no utente, pelo que são muitas as soluções que se podem encontrar na farmácia, o que torna possível uma escolha mais direcionada bem como a possibilidade de explorar várias hipóteses.

Na farmácia não existe apenas uma grande variedade de cosméticos, medicamentos não sujeitos a receitas medica (MNSRM) e suplementos, os Medicamentos Sujeito a Receita Médica também existem com uma grande variedade de laboratórios, o que permite satisfazer as necessidades e preferências dos utentes e médicos, e me possibilitou o conhecimento de grande parte das opções existentes no mercado.

V. Autonomia e responsabilidade

No decorrer do estágio foi-me dada autonomia na realização de tarefas individuais, como a receção de encomendas e a realização de atendimentos. A autonomia vinha acrescida de responsabilidade, o que me levou a criar as minhas próprias estratégias para ultrapassar, com sucesso, as diversas situações não previsíveis ou para as quais não estaria preparada, à partida.

Considero a autonomia e a responsabilidade dada no estágio um ponto forte pois muniram-me das ferramentas necessárias para poder realizar as diversas funções como um elemento da equipa.

2.3 - Pontos Fracos

I. Insegurança e receio inicial

Inicialmente senti insegurança e falta de confiança em relação aos meus conhecimentos, que me fizeram hesitar antes de desempenhar qualquer tarefa, principalmente no atendimento. O utente espera sempre uma resposta do farmacêutico a qualquer uma das suas dúvidas, o que inicialmente se mostrou assustador, pois deparei-me pela primeira vez com a responsabilidade que acarreta a profissão de farmacêutico. Contudo e com a ajuda de todos, ultrapassei as inseguranças iniciais, e consegui tirar o maior proveito do estágio.

II. Dificuldade em associar nome de marca aos princípios ativos

No decorrer do estágio, deparei-me com alguma dificuldade em associar o nome de marca aos princípios ativos dificultando assim a dispensa sendo esta, contudo, colmatada pelo uso do SIFARMA2000®. Muitas foram as vezes que os utentes pediram um medicamento específico referindo-se os mesmo pelo nome de marca o que me deixava desorientada pois não o associava ao princípio ativo, tendo de recorrer ao programa informático para poder identificar qual era o produto requerido bem como todas as especificidades do mesmo. No início, esta dificuldade mostrou-se mais impeditiva, contudo no decorrer do estágio, foi-se desvanecendo tanto pelo facto de já estar familiarizada com alguns nomes comerciais de fármacos, como pela maior perícia na utilização do SIFARMA2000®.

III. Prescrições em DCI

O facto de as prescrições médicas se fazerem em Denominação Comum Internacional (DCI) e o aumento exponencial da indústria de genéricos dificulta a dispensa. Os utentes confundem-se com as prescrições, pois não conseguem associar a DCI ao medicamento que costumam administrar.

Em diversas ocasiões, deparei-me com utentes que referiam pretender o medicamento que habitualmente tomam, contudo não sabiam identificar o laboratório a que pertencia, sendo que este era descrito como p.e. “aquele da caixa azul”. Como na generalidade dos casos são muitos os laboratórios existentes devido ao elevado número de genéricos, acrescido do facto do utente muitas vezes não ser cliente da farmácia, tornava-se impossível satisfazer o seu pedido o que inicialmente foi constrangedor para mim.

IV. Receitas manuais

Considero as receitas manuais um ponto fraco pois elas dificultam a dispensa principalmente para pessoas com pouca experiência como é o meu caso.

No meu dia-a-dia na farmácia poucas foram as vezes que me deparei com receitas manuais mas quando surgiam casos de dispensa deste tipo de receitas encontrei 3 dificuldades: (i) a percepção do que estava prescrito; (ii) a validação da receita, em que é necessário ter especial atenção à: identificação do utente, assinatura do médico prescriptor, vinheta do médico prescriptor, validade da receita, entidade responsável e número de beneficiário, número de unidades prescritas, exceção para prescrição manual assinalada, ausência de rasuras ou rúbrica junto da rasura; (iii) e a inserção de planos de participação especiais, como as portarias especiais para a doença de alzheimer ou doenças inflamatórias intestinais crónicas [3].

Todas estas dificuldades levaram a que recorresse ao auxílio dos colegas de equipa levando a que, por vezes, tivessem de interromper os seus atendimentos.

V. Muitos Utentes não habituais

A Farmácia do Forum é muito movimentada tendo um público muito diverso o que se torna um ponto positivo, porém, leva a que haja uma maioria de utentes não habituais, que se deslocam à farmácia por conveniência.

Dos utentes não habituais que se desconhecem as patologias base bem como as terapêuticas já instituídas, é dificultando o aconselhamento, e impossibilitando o controlo farmacoterapêutico.

O *feed-back* que é uma mais valia aquando do aconselhamento, uma vez que contribui para que o farmacêutico se sinta seguro em relação ao produto que aconselhou, não existe com este tipo de utente, bem como ocorre uma menor relação farmacêutico-utente, de fulcral importância para que o farmacêutico possa, de forma consciente, responsável e atenta, desenvolver a sua atividade.

2.4- Oportunidades

I. Aconselhamento dermocosmético

Inicialmente o meu conhecimento em dermocosmética era muito rudimentar, o que contribuía para a insegurança no aconselhamento deste tipo de produtos. Contudo, com o decorrer do estágio e o facto de haver muita procura por estes produtos bem como muita diversidade na farmácia, possibilitou-me consolidar, reestruturar e completar esses conhecimentos.

Tive a oportunidade de lidar com vários utentes que procuravam respostas para problemas de pele e/ou capilares o que depois de uma ajuda inicial, me permitiu fazer um aconselhamento seguro e preciso nesta área.

II. Formações Marcas e laboratórios

Ao longo do estágio, tive a oportunidade de assistir a algumas formações principalmente em dermoscómica, mas não só, dadas pelas marcas e/ou laboratórios de alguns produtos.

Destas palestras/formações destaco: (i) uma sobre a menopausa, dada por um médico e que proporcionou a verificação não apenas das mudanças que ocorrem na mulher nesta idade mas, essencialmente de que modo o farmacêutico pode intervir de forma a melhorar a qualidade de vida das utentes, como ainda nos foi dado o panorama geral das prescrições médicas para estas situações; (ii) a da Eucerin® sobre protetores solares em que, inicialmente, também contou com a presença de um dermatologista, que elucidou acerca dos problemas do sol bem como as medidas a tomar; por fim destaco (iii) uma da Boiron® que me deu a oportunidade de contactar pela primeira vez com homeopáticos, embora não tenha aprofundado os conhecimentos nesta área dada a sua pouca procura na Farmácia do Forum.

Em todas as formações como havia vários profissionais de saúde, foi possível pelas partilhas de experiências enriquecer o meu conhecimento com casos reais transpondo-os para o contexto real das farmácias.

Considero assim as formações como uma boa oportunidade para aumentar os conhecimentos acerca de vários temas e ficar a conhecer melhor determinado produto para o poder aconselhar, muitas vezes através da técnica de *cross-selling*.

III. Autonomia

Além de um ponto forte a autonomia deu-me a oportunidade de desenvolver e demonstrar as minhas capacidades tendo contribuído para o meu enriquecimento como farmacêutica e para que findado o estágio tenha todas as ferramentas necessárias para me integrar no mundo profissional sem qualquer dificuldade.

IV. Farmácia: localização, equipa e equipamentos

Só por si o facto de ter feito o estágio numa farmácia de qualidade, bem situada e com movimento permitiu-me crescer tanto a nível profissional como pessoal. A experiência na Farmácia do Forum permitiu o desenvolvimento de várias capacidades, desde a comunicação a autonomia, tendo contribuído para que ganhasse metodologia de trabalho e me tronasse

assim capaz de ser uma boa profissional. Desta forma considero que ter realizado o meu estágio nesta farmácia, uma oportunidade da qual retirei muitos ensinamentos.

2.5- Ameaças

I. Imagem do estagiário para os utentes

Alguns utentes quando deparados com o estagiário demonstram desconfiança no atendimento indicando alguma subestima pelas suas capacidades e competência, preferindo inclusive ser atendidos por farmacêuticos.

Embora em minoria no decorrer do meu estágio, pois o grande numero de utentes não punha entraves ao atendimento, algumas foram as situações em que os utentes optaram por ser atendidos por outros colegas.

II. Atendimento Rápido

Alguns utentes principalmente os que recorrem à Farmácia do Forum, são pessoas que querem um atendimento rápido eficaz e sem direito a perguntas o que dificulta a função do farmacêutico. Corre-se o risco de haver uma banalização do ato farmacêutico pois o condicionalismo dos utentes para que demore o mesmo possível, bem como a recusa a prestação de informações necessárias leva a que o farmacêutico, embora com capacidades para o fazer, não consegue prestar o melhor serviço.

3- CASOS PRÁTICOS

3.1- Caso I - Onicomicose

Uma senhora dirige-se a farmácia pedindo um verniz para um fungo que tem na unha da mão, depois de constatar que de facto estava perante uma onicomicose, cor da unha, espessamento e fragilidade, questionei se tinha diabetes ou alguma outra patologia, referiu que apenas tinha hipertensão, sendo que a única medicação que tomava era para o controlo da PA. Aconselhei assim o Locetar EF[®], que sendo um MNSRM contém amorolfina 50mg/ml, um antifúngico ^[4].

Expliquei o modo de utilização, referindo também que o tratamento deveria ser realizado uma ou duas vezes por semana sem interrupções até cura da unha, sendo que esta dependeria da sua capacidade de regeneração. Contudo o tratamento teria no máximo uma duração de 6 meses. Teci ainda outras recomendações para o correto tratamento, aludindo ao cuidado a ter para evitar infeção de outras unhas como a não utilização da mesma lima e/ou corta-unhas nas unhas sãs e na afetada ^[4].

3.2- Caso 2 - Obstipação

Uma jovem mulher dirige-se à farmácia, pedindo alguma coisa para a obstipação, mencionando que já não consegue defecar há 4 dias. Depois de perguntar se tinha havido alterações dos hábitos alimentares ou a instituição de nova terapêutica medicamentosa, foi-me referido que não tomava qualquer tipo de medicação e que não tinha feito alterações significativas na alimentação, indicando ainda não sofrer de nenhum desconforto abdominal. Mencionei então as medidas não farmacológicas que deveria realizar como não evitar a evacuação, comer mais alimentos com fibras (p.e: frutas, vegetais fresco), fazer exercício físico regularmente e beber muita água ^[5]. Como verifiquei que a jovem senhora estava muito preocupada pelo tempo a que se encontra sem defecar, aconselhei o Microlax[®] (citrato de sódio, 450 mg e laurilsulfoacetato de sódio 45 mg) que é um laxante de contacto de uso retal que atua pela peptização das matérias fecais levando ao amolecimento das mesmas, provocando a defecação entre 5-20 minutos após a administração ^[6]

Referi que poderia aplicar até 2 cânulas se com 1 não visse resultados. Reforcei a necessidade de aplicar as medidas não farmacológicas mencionadas de forma a controlar o problema, alertando para o facto de dever só utilizar o Microlax[®] em situações específicas de necessidade ^[6]. Aconselhei assim o DulcoSoft[®], um dispositivo médico que contém Macrogol 4000, para utilização diária, pois sendo uma laxante osmótica, o DulcoSoft[®] é pouco irritante para o intestino. Este leva ao amolecimento das fezes por hidratação das mesmas conduzindo também ao aumento do movimento intestinal, facilitando assim a evacuação ^[7].

Recomendei a visita ao médico, para uma análise mais detalhada, caso a obstipação persistisse.

3.3 - Caso 3 - Inflamação da garganta

Homem dirige-se à farmácia queixando-se de dor aguda na garganta que dificulta a ingestão. Questionei se tinha tido febre, dor de cabeça, tosse, dificuldade em fazer movimentos com a cabeça, as amígdalas inchadas e a garganta com pintas brancas ou avermelhada, respondendo negativamente a todas as questões referiu que se tratava apenas dor e inchaço a nível da garganta. Como depois de interrogado mencionou que não sofria de nenhuma de patologia bem como não estava a tomar qualquer tipo de medicação, recomendei pastilhas Strepfen[®] que contêm 8,75 mg de flurbiprofeno, que é um anti-inflamatório não esteroide tendo uma ação analgésica e anti-inflamatória local proporcionando o alívio das dores e da inflamação, sendo que podia tomar até 5 pastilhas por dia ^[8]. Recomendei a não ingestão de alimentos a temperaturas extremas para não ser agressivo para a já, à partida, existente

inflamação. Referi o facto de que a administração de um imunoestimulante à base de vitamina C e equinácea pudesse ser benéfica.

Referi para se caso continuasse com as dores ao fim de 5 dias ou caso tivesse febre, deveria consultar o médico uma vez que a situação poderia evoluir para uma infeção.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos quase 4 meses de estágio pude vivenciar que o farmacêutico em FC é multifacetado e dotado de um grande conhecimento científico atualizado, devendo ter inteligência emocional suficiente para lidar com as situações com que se depara na farmácia mantendo sempre o profissionalismo.

Compreendi o quão são essenciais conhecimentos de gestão e organização visto que, para todas as funções desempenhadas, estes são alicerces fulcrais para o bom funcionamento da Farmácia enquanto uma entidade que tem um leque imenso de produtos. No entanto, pude também perceber que, embora seja muito importante esta componente, há uma outra que me suscita ainda mais admiração por quem, diariamente, exerce tão bem o papel do Farmacêutico. A responsabilidade, o humanismo, a simpatia e a procura incessante por contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos doentes é aquilo que mais me impressiona e que, só vivendo esta realidade se compreende. Portanto, constatei que há um misto de sentimentos que vão muito para além do que aprendemos na faculdade.

Ao realizar este Relatório fiquei com a nítida percepção de que o estágio em farmácia foi essencial para consolidar saberes do MICF e munir-me de bagagem suficiente para poder encarar o mundo laboral com maior profissionalismo e destreza.

A Farmácia do Forum também foi uma enorme mais-valia que levo comigo e, aliás, considero que não poderia ter escolhido melhor. A farmácia, a equipa e todos os utentes deram-me todas as ferramentas para que pudesse enriquecer-me tanto a nível profissional, como pessoal.

A título de conclusão, penso que toda esta experiência foi uma mais valia pois possibilitou-me a criação de alicerces para um futuro promissor.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **DECRETO-LEI nº 288/200**. Diário da República I^a Série. nº 261 (10 de novembro de 2001) p. 7150-7165.

2. **PORTUGAL. Ministério da Saúde - Portaria nº 594/2004 de 2 de Junho**. Diário da República nº 129 - Série I-B (2004) 3441-3445.

3. **Regimes excecionais de comparticipação**. [acedido a 1 de Setembro de 2017]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/regimes-excecionais-de-comparticipacao>

4. **Protocolo de Dispensa Exclusiva em Farmácia (EF)** [acedido a 1 de setembro de 2017]. Disponível em : http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/3_Amorolfina_2015_02_18.pdf/0d9ef3f0-7eb0-4e53-9bf8-d54f22528362.

5. **Ficha técnica do CIM- Aconselhamento farmacêutico na obstipação em Adultos** [acedido a 30 de julho de 2017]. Disponível em: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vpIKmcbieHA\]:site.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/doc8853.pdf+&cd=7&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vpIKmcbieHA]:site.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/doc8853.pdf+&cd=7&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt).

6. **Resumo das Características do Medicamento: Microlax®** [acedido a 1 de setembro de 2017]. Disponível em: http://www.jaba-recordati.pt/uploads/ficheiros_produtos/microlax-laxante-para-prisao-de-ventre-rcm_10-03-2017.pdf>.

7. **Resumo das Características do Medicamento: DulcoSoft®** [acedido a 3 de setembro de 2017]. Disponível em :<URL: <https://www.dulcolax.pt/dulcosoft.html>>.

8. **Resumo das Características do Medicamento: Strepfen®** [acedido a 1 de setembro de 2017]. Disponível em: <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/medicamentos/strepfen-mel-e-limao/rcm>

Anexo I –Preparação do Trimetoprim a 1%

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 1 de 3

Medicamento: Suspensão oral de Trimetoprim 1%

Teor em substância(s) activa(s): 100 g (ml ou unidades) contém 1g de Trimetoprim

Forma farmacéutica: Suspensão Oral Data de preparação: 29/05/2017

Número do lote: 44/2017 Quantidade a preparar: 50ml

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ou ml, ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Essência de banana	144000010	DALLANT		1ml	0.5ml	0.5ml	[assinatura]	[assinatura]
Trimetoprim	1315096	Acoforma		1g	0.5g	0.5g	[assinatura]	[assinatura]
Xarope Comum	440000010	Fagon		qº 100ml	qº 50ml	qº 50ml	[assinatura]	[assinatura]

Preparação

1. Verificar o estado de limpeza do material.
2. Pesar o trimetoprim e transferir para almofariz de porcelana.
3. Pulverizar e adicionar, aos poucos, o xarope comum e misturar.
4. Transferir para proveta.
5. Lavar o almofariz com xarope e juntar à proveta. Adicionar a essência de banana.
6. Completar o volume com xarope comum.
7. Rotular.

Embalagem

Tipo de embalagem: Frasco de vidro âmbar tipo III
Capacidade do recipiente:

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
Frasco de vidro âmbar tipo III, 60ml		

Operator: [assinatura]

ISP 10.3

i)

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 2 de 3

Prazo de utilização e Condições de conservação

Condições de conservação: Conservar no frasco no recipiente bem fechado. Operator: [assinatura]

Prazo de utilização: 30 Dias Operator: [assinatura]

Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do Operador
Color	Opaco	Conforme	[assinatura]
Aspecto	Heterogêneo	Conforme	[assinatura]

Aprovado Rejeitado

Supervisor: [assinatura] 29/05/2017

Nome, morada e telefone do doente

[redacted]

Nome do prescrictor

[redacted]

Assinaturas

ii)

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 3 de 3

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:		embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma desta quantidade unitária (e/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor de matéria-prima utilizada na preparação
matérias-primas	quantidade adquirida	preço de aquisição (e/IVA)	quantidade	preço				
Trimetoprim	100g	19,75€	1g	0,19€	X 0,5g	X 2,5		= 0,24€
Xarope Comum	1000ml	21€	1ml	0,021€	X 49 ml	X 1,5		= 1,86 €
Essencia banana	250g	12€	1g	0,19€	X 0,5 g	X 2,5		= 0,24€
subtotal A								2,44€

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:					
valor referente à quantidade base	forma farmacéutica	quantidade	F (%)	Factor multiplicativo	valor
	Suspensão	50ml	4,92	X 4,5	= 22,14€
Valor adicional					
subtotal B					22,14€

MATERIAL DE EMBALAGEM:					
material de embalagem	preço de aquisição (e/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor	
Frasco de vidro âmbar 60ml	0,56	X 1	X 1,2	= 0,69€	
subtotal C					0,69€

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

(A + B + C) x 1,3 = 32,86€
+ IVA = 1,97€
D = 34,83€

DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:

dispositivo	preço unitário	quantidade	valor
E			

PREÇO FINAL: D+E = 34,83 €

Operator: [assinatura] Supervisor: [assinatura]

Fabrica do Doente: Técnico Data

iii)

Imagem 1- Ficha de preparação do Trimetoprim a 1% (i, ii e iii)

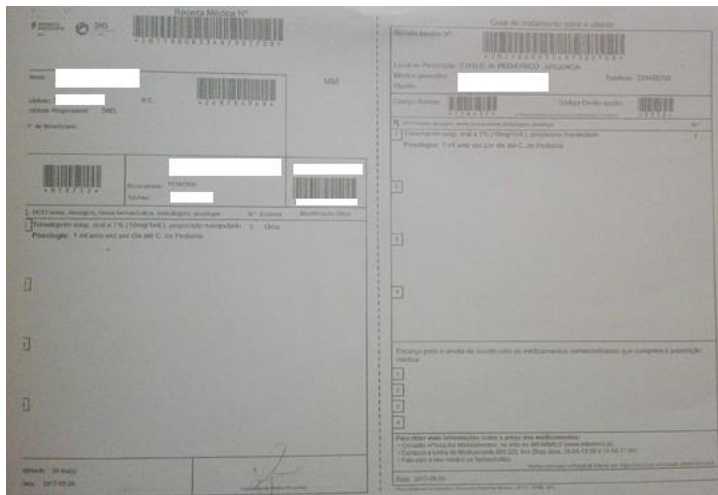


Imagem 2- Receita do Trimetoprim 1%

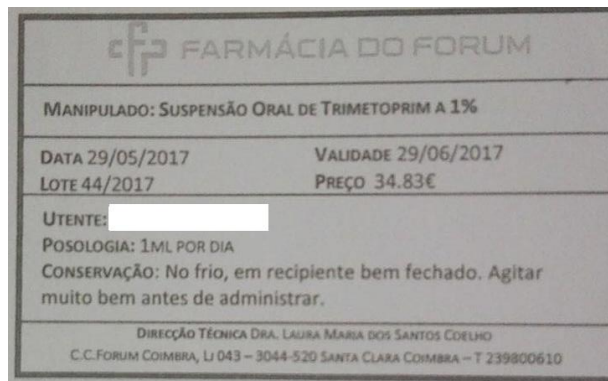


Imagem 3- Rótulo do Trimetoprim 1%

Anexo 2 –Preparação de Solução de ácido bórico à saturação

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 1 de 3

Medicamento: Solução Alcoólica a 70° de ácido Bórico à Saturação
 Teor em substância(s) activa(s): 1g/100 ml de Solução Alcoólica a 70°
 Forma farmacéutica: Solução
 Data de preparação: 04/05/2017
 Número do lote: 1 Quantidade a preparar: 200 ml
 38/2017

Materiais-primas	Lote nº	Origem	Farmacopéu	Quantidade para 100 g (ou ml, ou unidade)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Ácido Bórico	041715	S.D.C		6,3,49	12,3,92	12,3,92	João Silva	JM
Água Purificada	00002172	BONEX		24,5	49,05	49,05	João Silva	JM
Álcool Bórico	004-BOR-231283	FARMA		5	10	10	João Silva	JM

Preparação

- Preparação da solução Alcoólica a 70° (V/V)
- Colocar a quantidade calculada de ácido bórico a 70°
- Adicionar o álcool bórico e adicionar água purificada sempre adaptando
- Após alcançar total do ácido bórico completar volume com água purificada
- Deixar repousar a solução (1h) agitando a cada 15 minutos
- Transferir a solução saturada de ácido bórico para frascos esterilizados a 121°C/15'
- Etiquetar e Rotular os recipientes

Embalagem

Tipo de embalagem: Frasco de vidro âmbar
 Capacidade do recipiente: 300 ml

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
Frasco de vidro âmbar 300 ml		

Operator: João Silva

i)

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 2 de 3

Prazo de utilização e Condições de conservação

Condições de conservação: conservar em frasco de vidro âmbar a 5°C-15°C bem fechado e manipular alocado
 Operator: João Silva
 Prazo de utilização: 04/05/2017 dias

Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do Operador
Aspecto	incolores	conforme	JM
Sabor	insípido	conforme	JM

Aprovado Rejeitado
 Supervisor: JM 04/05/17

Nome, morada e telefone do doente
 Nome do prescriptor
 Anotações

ii)

Imagem 1- Ficha de preparação Solução a 70° de ácido Bórico à saturação (i, ii e iii)

FARMÁCIA DO FORUM Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 3 de 3

Cálculo do preço de venda

MATERIAS-PRIMAS:

materiais-primas	embalagem existente em estoque		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (MVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor de materia-primas utilizadas na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (MVA)	quantidade unitária	preço			
Ácido Bórico a 70° (V/V)	4,05	11,2	11,2	39,6	1,8	7,2	
Água Purificada	11	4,45	4,45	13,2	1,1	4,9	
Álcool Bórico	2,0	14,2	14,2	2,5	1,2	17,0	
subtotal A							1,68

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:

forma farmacéutica	quantidade	F (€)	factor multiplicativo	valor
Solução	1	14,2	3	42,6
subtotal B				42,6

MATERIAL DE EMBALAGEM

materiais de embalagem	preço de aquisição (MVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor
Frascos de vidro âmbar 100 ml	1,10	1	1,2	1,32
subtotal C				1,32

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

(A + B + C) x 1,25 = 2,30
 + IVA = 4,32
 D = 24,40

DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:

dispositivo	preço unitário	quantidade	valor
E			

PREÇO FINAL: D+E = 24,40

Operator: João Silva Supervisor: JM

iii)

FARMÁCIA DO FORUM

MANIPULADO: Solução alcoólica a 70° de ácido Bórico à saturação

DATA 04/05/2017 Validade: 04/07/2017
 LOTE 38/2017 Preço 24.40€

ÚTENTE:
 POSOLOGIA: USO EXTERNO
 CONSERVAÇÃO: Local fresco e seco. Recipiente bem fechado

DIRECÇÃO TÉCNICA DRA. LAURA MARIA DOS SANTOS COELHO
 C.C. FORUM COIMBA, L1 043 - 3044-520 SANTA CLARA COIMBA - T 239800610

Imagem 2- Rótulo da Solução a 70° de ácido Bórico à Saturação

Parte II

Relatório de estágio curricular Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda.

Lista de siglas e abreviaturas

CIOMS	do inglês, Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas
EMA	do inglês, Agência Europeia de Medicamentos
GVP	do inglês, Boas Práticas de Farmacovigilância
MICF	Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas
NLS	do inglês, Pesquisa nacional
Phagecon	Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda.
PNT	Procedimentos normalizados de trabalho
PSUR	do inglês, Relatório Periódico de Segurança
RAM	Reação adversa medicamentosa
RCM	Resumo das Características do Medicamento
RMP	do inglês, Plano de gestão de risco
SWOT	do inglês, Pontos Fortes, Fracos, Oportunidades e Ameaças

I - INTRODUÇÃO

Inserido no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Universidade de Coimbra, o Estágio Curricular é realizado no 2º Semestre do 5º Ano, tendo a duração de 810h.

A Faculdade de Farmácia oferece aos seus alunos a possibilidade de realizar o Estágio Curricular em diferentes áreas associadas à profissão farmacêutica, disponibilizando assim, uma oportunidade para alargar horizontes e contactar com outras realidades laborais.

Tendo em conta esta possibilidade, a minha escolha para o primeiro período de Estágio Curricular recaiu na Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda. (Phagecon).

A Phagecon é uma empresa portuguesa dedicada à indústria farmacêutica, fundada em janeiro de 2006 com o objetivo de responder à crescente demanda dos requisitos da indústria, disponibilizando um alto nível de expertise técnica e científica desenvolvendo atividades de consultoria farmacêutica, tanto a nível nacional como internacional apoiando diversas empresas ^[1].

Esta empresa cujas instalações situam-se em Lisboa é uma empresa inovadora, que para dar uma resposta adequada em todas as áreas do sector farmacêutica encontra-se dividida em 4 departamentos. Cada serviço prestado pela empresa é, portanto, específico de um departamento.

O meu estágio curricular decorreu no departamento de farmacovigilância sob orientação da Dr. Vanessa Fachada, entre os dias 9 de janeiro e 31 de março de 2017, tendo sido uma experiência enriquecedora que me permitiu não só consolidar os conhecimentos previamente adquiridos como me proporcionou a oportunidade de os enriquecer.

O presente relatório tem como objetivo avaliar e detalhar a minha experiência enquanto estagiária, realçando os pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças (SWOT) da mesma.

2 - FARMACOVIGILÂNCIA

Nos anos 50 surge a farmacovigilância como o conjunto de atividades de deteção, registo e avaliação de reações adversas, com o objetivo de determinar a incidência, gravidade e nexo de causalidade com os medicamentos. Esta baseia-se, assim um estudo sistemático e multidisciplinar dos efeitos do medicamento. ^[2]

Devido a mudanças recentes na legislação, Diretiva 2001/83/EC, e o desenvolvimento das boas praticas de farmacovigilância (GVP), muitos são os desafios apresentados às empresas farmacêuticas, nesta área.

A Phagecon desenvolveu assim um portfólio de soluções de modo a responder à demanda da indústria farmacêutica por serviços de consultoria. Sendo que os serviços de farmacovigilância prestados vão desde a implementação de um sistema de farmacovigilância completo, à realização de atividades de farmacovigilância necessárias e obrigatórias ou ao simples desempenho de tarefas específicas pontuais. [1]

3 - ANALISE SWOT

3.1 - Tabela Resumo

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> - Primeira Semana; - Pesquisa Nacional; - Reação adversas e Preenchimento de formulários CIOMS; - Elaboração de RMPs, PSURs e Adendas clinicas; - Integração na equipa; - Coordenação entre departamentos; - Existência de PNTs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de tempo para uma maior disponibilidade da equipa.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> - Uso do inglês; - Formações Internas; - Integração de conhecimentos; - Conhecimento informático; - Utilização de diferentes bases de dados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de experiência prévia; - Domínio do Inglês.

3.2 - Pontos Fortes

I. Primeira semana

Tendo sido este estágio o meu primeiro contacto com uma empresa farmacêutica considero a semana inicial um ponto forte. Esta começou com a apresentação da Phagecon realizada pela Dra. Vanessa Fachada no meu primeiro dia, tendo sido uma mais valia importante porque ajudou a uma rápida percepção da dinâmica e da missão da empresa e dos vários

departamentos. Atento que à parte desta, a formação inicial em farmacovigilância foi igualmente relevante para rever conceitos bem como adquirir novos conhecimentos usados depois no decorrer do estágio.

A primeira semana em continuidade com o primeiro dia foi de conhecimento das normas, responsabilidades, procedimentos e métodos de trabalho implementados na Phagecon. O desempenho desta tarefa foi deveras importante uma vez que me permitiu ter contacto com o rigor e qualidade exigida às atividades realizadas. No decorrer dessa semana tive oportunidade de ler os procedimentos normalizados de trabalho (PNT), realizadas a nível interno bem como as GVP tendo-me sido esclarecidas as dúvidas que foram surgindo o que me proporcionou aumentar o conhecimento nesta área bem como me dar ferramentas necessárias as atividades realizadas posteriormente, como a elaboração de relatórios periódicos de segurança (PSUR), plano de gestão de risco (RMP), relatórios do conselho para organizações internacionais de ciências médicas (CIOMES) entre outras.

Resumidamente, a semana inicial embora tenha sido meramente informativa foi importante para o desenrolar de todo o estágio considero-a assim um ponto forte.

II. Pesquisa Nacional

A pesquisa de literatura a nível nacional (NLS) e a nível internacional é uma das atividades diárias realizadas pela equipa do departamento de farmacovigilância. Durante o estágio pude participar na pesquisa a nível nacional o que considero que foi uma mais valia.

O objetivo da atividade realizada era o de assegurar a recolha e o adequado processamento de todas a documentação que continha informação de segurança considerada relevante para posterior inclusão na literatura de alguns documentos como por exemplo, adendas clínicas, PSURs, RMPs, entre outros. É considerada revelante toda a informação que possa incluir: (i) a utilização em populações especiais: grávidas, lactantes, população pediátrica, idosos, insuficientes cardíacos, hepáticos e renais; (ii) o uso *off-label*; (iii) a sobredosagem, abuso ou mau uso; (iv) a exposição ocupacional e/ou prolongadas; (v) as informações sobre interações, eficácia, efetividade e efeitos de classe; e (iv) os erros de medicação (como erros de prescrição, erros de dispensa ou erros de administração).

Concluindo, no que diz respeito à NLS, a minha tarefa passou apenas por identificar informação de segurança revelante, relacionada com uma lista de substâncias ativas e/ou nomes comerciais em artigos de revistas portuguesas as quais a Phagecon tem subscrição. Considero uma mais valia a realização desta atividade, porque me permitiu adquirir uma maior consciencialização da envolvência e da importância da revisão periódica da literatura, associada a uma ampla percepção daquilo que é passível de ser considerado como informação de segurança revelante.

III. Reações adversas e preenchimento de formulários CIOMS:

Quando surgiam casos de suspeita de reação adversa medicamentosa (RAM), reação nociva e não intencional a um medicamento ^[3] é necessário proceder à sua validação e posterior preenchimento do formulário CIOMS. Para proceder à validação é necessário reunir o máximo de informação possível sendo, para efeitos regulamentares, só considerada válida uma determina suspeita de reação adversa que reúna os quatro critérios mínimos:

- i) Notificador identificado – iniciais do nome/ morada e sempre que possível registro do contacto, a fim de possibilitar *follow-up*.
- ii) Doente identificável – através de pelo menos um dos seguintes dados: iniciais do nome, género, data de nascimento, idade ou grupo etário.
- iii) Medicamento/substância suspeita de causar a reação;
- iv) Reação adversa suspeita, se possível caracterizada. ^{[2] [4]}

Posteriormente à validação da RAM procede-se então ao preenchimento do formulário CIOMS no qual é necessária a classificação da RAM em termos do dicionário médico para atividades regulamentares, avaliação quanto à sua gravidade, previsibilidade, assim como imputação de causalidade. Caso se trate de uma RAM grave deve-se, no prazo de 15 dias consecutivos ao dia que se tem conhecimento do caso, reportar às autoridades competentes, caso seja uma RAM não grave o prazo passa a ser de 90 dias ^[4].

No período em que realizei o meu estágio tive a possibilidade de preencher formulários CIOMS não só de casos encontrados na literatura, mas também de RAM reportadas por consumidores, farmacêuticos e médicos. Considero esta tarefa foi uma boa oportunidade para colocar em prática o saber adquirido na cadeira de “Farmacovigilância e Epidemiologia”, pois a maioria dos termos e conceitos utilizados na execução desta atividade já eram por mim conhecidos das aulas desta unidade curricular.

IV. Elaboração de RMP, PSUR e adendas clinicas

No âmbito das atividades realizadas no departamento de farmacovigilância durante o estágio tive oportunidade de ter contacto com relatórios periódicos de segurança (PSUR) plano de gestão de risco (RMP) e adendas clinicas, sendo que participei na realização de algumas secções dos mesmos. Já na parte final do meu estágio realizei na íntegra um PSUR.

O RMP, incluem informações sobre perfil de segurança do medicamento, identificação dos riscos de utilização dos medicamentos, formas de os evitar ou minimizados pelos pacientes, bem como planos para estudos e outras atividades que têm como objetivo adquirir mais conhecimento sobre a segurança e eficácia do medicamento. Este deve ser entregue aquando da solicitação da autorização de introdução no mercado (AIM) à autoridade competente, podendo ser à agência europeia do medicamento (EMA) ou à autoridade

competente nacional (ACN). Os RMPs devem ser continuamente atualizados e enviados sob solicitação da EMA/ACN ou sempre que ocorrem alterações no balanço risco/benefício do medicamento e seja necessário implementar medidas de gestão de risco adicionais ^[5].

O PSUR é uma ferramenta para avaliação dos riscos no pós-autorização, este reporta a avaliação do balanço risco/benefício do fármaco bem como o resultado de todos os estudos realizados no intervalo de tempo desde a data *lock point* do último PSUR. Uma vez que PSUR sumariza toda a informação de segurança do medicamento é usado pela EMA/ACN para reavaliar o balanço risco/benefício, sendo que esta emite uma recomendação que pode passar pela suspensão, revogação da AIM ou introdução de um novo uso para o medicamento ^[6].

As adendas clinicas encontram-se na documentação que é necessária submeter aquando da renovação de AIM, esta inclui todas as informações revelantes que afetem a segurança do fármaco ^[7].

Em relação aos PSURs, inicialmente apenas elaborei alguns pontos como o *17.1- Important Baseline Efficacy and Effectiveness Information*, *18.1-Benefit-risk Context – Medical Need and Important Alternatives* e *18.2- Benefit-risk Analysis Evaluation*. Esta tarefa possibilitou-me o primeiro contacto e familiarização com o formato, bem como me forneceu conhecimentos para a sua posterior realização na integra. Na concretização do PSUR recorri ao resumo das características do medicamento (RCM) onde identifiquei e separei os riscos em “identified” “potential” e “missing information”, posteriormente realizei a avaliação dos mesmos. A concretização do PSUR foi importante para o meu crescimento nesta área pois a sua realização engloba a percepção de vários conceitos importantes.

Nos RMPs e adendas clinicas, apesar de só ter realizado algumas das suas secções, permitiu-me verificar que apesar de muito semelhantes o RMP, PSUR e adendas clinicas têm particularidades próprias, como a forma de escrever.

V. Integração na equipa:

A equipa que integra a Phagecon é uma equipa jovem, profissional, bem coordenada, dinâmica e simpática, o que me possibilitou uma fácil integração. Desde o dia inicial foi demonstrado por todos os elementos do departamento de farmacovigilância, uma grande vontade para ensinar, sendo que todos de uma certa forma contribuíram para que eu pudesse tirar o maior proveito do meu estágio.

VI. Coordenação entre departamentos:

O facto de todos os departamentos da Phagecon trabalharem em *open offices*, possibilitou-me verificar toda a coordenação e dinamismo com que se trabalha nesta empresa, bem como o trabalho realizado pelos outros departamentos. A articulação dos diferentes sectores foi evidente no caso da preparação de todos os documentos para renovação de AIM.

Esta cooperação possibilitou-me o conhecimento de exigências legais para mim desconhecidas até então.

VII. Existência de PNTs:

A existência de PNTs bem como a adoção da *ISO 9001:2008* permitem a obtenção de resultados de qualidade, que vão de encontro com as necessidades e expectativas dos clientes. Estas possibilitam proceder de modo específico e adequado tendo a garantia de que qualquer que seja a pessoa a realizar a tarefa o objetivo da empresa esteja cumprido, bem como haja uma melhora contínua ^[9].

Atento, assim, que a existência de PNTs e a adoção da *ISO 9001:2008* por parte da empresa um ponto forte no meu estágio, pois proporcionou-me um rápido conhecimento de como se deve proceder na realização de todas as tarefas.

3.3 - Pontos Fracos:

I. Falta de tempo para uma maior disponibilidade da equipa:

O único ponto fraco que realço foi o facto de a equipa ter pouco tempo disponível, devido aos prazos apertados para cumprir projetos. Como os elementos do departamento do disponham de pouco tempo “livre” não conseguiam realizar um acompanhamento direto do trabalho que ia realizando, impedindo também a diversidade de tarefas que me eram dadas, bem como impossibilitavam o *feedback* ao trabalho efetuado. Considero assim a falta de tempo da equipa um ponto fraco, pois impediu que fosse evoluindo a cada tarefa realizada, impossibilitando que tirar-se maior proveito do estágio.

3.4 - Oportunidades:

I. Uso do Inglês:

Considero o uso do Inglês uma oportunidade, já que todos os documentos que se pretendiam bem como os documentos fornecidos encontravam-se neste idioma, permitindo-me praticar esta língua ao longo do estágio. Ao desempenhar as diversas tarefas propostas, foi-me ainda possível enriqueci o vocabulário levando ao incremento do meu saber nesta área.

II. Formações internas:

Na semana inicial do meu estágio, foram-me dadas pequenas formações pelos diversos colaboradores do departamento que contribuíram para que pudesse compreender melhor a importância e obrigações das atividades de farmacovigilância, bem como a forma como estas são realizadas no departamento.

Durante o estágio pude, ainda, assistir a pequenas apresentações, que formam parte da estratégia da Phagecon para dar a conhecer as novas informações e normativas, tanto na área regulamentar como na farmacovigilância, a todos os elementos da empresa de uma forma mais aliciente, permitindo assim que toda a equipa esteja atualizada.

Resumidamente, como o setor farmacêutico está em constante renovação e mudança é imperativo que nós, farmacêuticos, mesmo na qualidade de consultores nos mantenhamos atualizados, pelo que considero que as formações internas e externas uma mais-valia. Estas foram assim, uma oportunidade para apreender mais sobre diversos assuntos tanto na área da farmacovigilância como na de assuntos regulamentares.

III. Integração do conhecimento adquirido MICF:

No decorrer do meu estágio tive oportunidade para por em prática o saber adquirido na MICF especialmente na área de farmacovigilância. Foi assim, muito gratificante aplicar os conhecimentos teóricos previamente obtidos e perceber que estes nos dão bases sólidas e necessárias ao desempenho da atividade profissional de forma correta, responsável e eficaz.

IV. Conhecimentos informáticos:

As atividades realizadas foram efetuadas recorrendo ao software Microsoft Office®, nomeadamente Word e ao Excel, tendo esta sido uma oportunidade para aprofundar o conhecimento destas ferramentas e descobrir utilidades que até então eram desconhecidas.

V. Utilização de diferentes bases de dados:

Na realização de diferentes tarefas tive de recorrer a vasto leque de bases de dados, como “Micromedex”, “Medicines complete” e “Drugs.com”, o que me proporcionou o alargamento dos meus conhecimentos a nível de fontes de informação. Ao realizar diversas atividades de pesquisas de informação, tive ainda a oportunidade de contactar e percorrer os sites das autoridades regulamentares de diferentes países da união europeia.

O contacto com as diferentes fontes de informação, proporcionou-me a aquisição de ferramentas necessárias para a obtenção de informações mais fidedignas, levando igualmente a diminuição do tempo despendido a procura destas.

3.5 - Ameaças:

I. Falta de experiência prévia:

Durante a realização de algumas tarefas apercebi-me que embora, muitos fossem os conhecimentos que detinha devido a unidade curricular de “Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia”, a sua concretização foi-me dificultada pela falta de experiência na realização das mesmas, isto é, por exemplo na realização de PSURs e de RMPs o tempo

dedicado a procura de informação, bem como a percepção do que era pedido em cada seção foi muito elevado tendo sido um impedimento para a realização de outras atividades.

Observo, assim que a falta de experiência e familiarização tanto na procura de informação como com os próprios documentos uma ameaça a realização de certas tarefas do estágio.

II. Domínio da Língua Inglesa

Como a minha formação base na língua Inglesa é o ensino obrigatório tendo tido o último contacto com a disciplina no 12ºano, já considera o inglês como um ponto fraco para mim. Contudo no decorrer do estágio este foi mais evidente, defrontei-me várias vezes com algumas dúvidas na gramática, bem como no vocabulário dúvidas essas que me impediram de realizar as tarefas mais atempadamente. Depois do estágio realizado foi mais presente para mim que o inglês é importantíssimo nesta área.

Considero assim que o meu nível de inglês a altura do estágio uma ameaça a realização de muitas tarefas, tendo sido uma oportunidade de melhorar.

4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a finalização do estágio curricular realizado na Phagecon, posso concluir que esta foi uma experiência única de aprendizagem e enriquecimento tanto pessoal como profissional dotando-me de bagagem importante na área da farmacovigilância.

O balanço que faço e que é visível ao longo deste relatório na forma de análise SWOT é bastante positivo tendo este estágio sido uma oportunidade da qual retirei grandes aprendizagens e que me possibilitou a consolidação de alguns conceitos adquiridos ao longo do MICF.

Ao redigir este relatório espero ter dado a conhecer a minha experiência e opinião sobre as diversas atividades realizadas, de uma forma de clara e precisa.

Agradeço novamente a toda a equipa, Phagecon, na pessoa da Dr^a Vanessa Fachada, pela disponibilidade que sempre demonstrou em esclarecer todas as minhas dúvidas e por todos os conhecimentos e experiências que partilhou comigo, acrescentando sempre algo novo e cultivando em mim um espírito de aprendizagem permanente.

Fazendo uma retrospeção, creio que apesar de que ainda muito ficou por aprender, muito foi o conhecimento que adquiri ao longo dos três meses.

Resumindo, só tenho que agradecer a oportunidade que tive a qual me opulentou como pessoa e profissional.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Phagecon- Consultoria farmacêutica, Ida.** [acedido a 20 de jul. 2017]. Disponível na internet: <http://www.phagecon.pt/>.
2. **European Medicines Agency - Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP Annex I – Definitions (Rev 3).** 15 de abril 2014. [acedido a 26 de jul. 2017]. Disponível na internet: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/05/WC500143294.pdf.
3. **Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho .**25 de outubro 2012. [acedido a 27 de Jul. 2017] Disponível na internet: http://www.infarmed.pt/documents/...2001_83.../dfd961a0-b5c0-4f10-81d7-c554d0cb4b4c.
4. **European Medicines Agency - Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) - Module VI - Management and reporting of adverse reactions to medicinal products (Rev I).** 8 de setembro de 2014. [acedido a 26 de jul. 2017]. Disponível na internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/201/09/WC500172402.pdf.
5. **Questions and answers on the risk management plan (RMP) summary.** 30 Mar 2017. [acedido a 27 de jul. 2017]. Disponível na internet: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000360.jsp.
6. **Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) Module VII – Periodic safety update report.** 29 Dez 2013. [acedido a 26 de jul. 2017] Disponível na internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/04/WC500142468.pdf.
7. **European Comission - CMDh BEST PRACTICE GUIDE ON THE PROCESSING OF RENEWALS IN THE MUTUAL RECOGNITION AND DECENTRALISED PROCEDURES. Abril 2013** [acedido a 27 jul. de 2017]. Disponível na internet: http://www.gmpcompliance.org/guidemgr/files/GUIDE_RENEWALS_MRP_DCR_2013_07_EN.PD.
8. **Bureau Veritas Portugal.** [acedido a 28 jul. de 2017]. Disponível na internet: <http://www.bureauveritas.pt/services+sheet/certificacao-iso-9001>

Part III

Monographic

**“Cellular and Molecular Toxicology of
Nanoparticles: A laboratorial approach”**

RESUMO

As propriedades versáteis das nanopartículas e o seu potencial de aplicação em diversas áreas, aumentam o número de nanomateriais bem como as suas aplicações. O elevado aumento do uso de nanopartículas apresenta uma importante preocupação toxicológica. As nanopartículas são consideradas promissoras na área biomédica, no entanto, as atividades biológicas bem como a toxicidade devem ser avaliadas antes de qualquer aplicação clínica.

Até ao momento, as nanopartículas têm sido associadas à toxicidade celular, genética e imunológica. Dos mecanismos envolvidos na toxicidade da nanopartículas, nanotoxicidade, o que mais se salienta é o da indução de espécies reativas de oxigénio, que conduz ao stress oxidativo.

A nanotoxicidade depende das propriedades físico-químicas das nanopartículas, como a sua composição química, tamanho, forma, superfície, entre outras. Tronando essencial a caracterização destas bem como a sua avaliação, antes, durante e após os ensaios efetuados.

A avaliação da toxicidade das nanopartículas é realizada recorrendo a análises *in vitro* e *in vivo*, contudo existe uma lacuna nas informações obtidas nestas duas análises. Assim, com a finalidade de diminuir essa lacuna, bem como para reduzir o uso de animais, impondo um rápido *screening* de nanotoxicidade, modelos mais confiáveis e como maior valor preditivo têm sido desenvolvidos pelos investigadores.

Nesta revisão, são referidos os principais mecanismos responsáveis pela nanotoxicidade bem como os fatores que a influenciam e que deverão ser tidos em consideração a quando do desenho e interpretação dos ensaios de toxicidade. É ainda feita referencia aos modelos experimentais de caracterização do perfil toxicológico das nanopartículas mais usados bem como os recentemente introduzidos, dando-se uma visão geral dos pontos positivos e negativos dos mesmos.

Palavras chave: Nanopartículas. Nanotoxicologia. Stress oxidativo. Ensaios celulares. Modelos *in vivo*. Análise experimental.

ABSTRACT

The versatile properties of nanoparticles and their potential application in many areas lay expanding the use of engineered nanomaterials along with their applications. The vastly increase of nanoparticles uses presents an important toxicological concern. The nanoparticles emerge as promising field in biomedical area, however, toxicity and biological activities should be evaluated before starting any clinical application. So far, the toxicity of nanoparticles has been associated with cell toxicity, genotoxicity and immunotoxicity. The induction of reactive oxygen species that leads to oxidative stress is the most emphasizing of the several mechanisms that are involved in the toxicity induced by nanoparticles, nanotoxicity.

The nanotoxicity depend on the physical-chemical properties of the nanoparticles, such as chemical composition, size, shape, surface etc. For this reason, it is essential to characterize and evaluate these before, during and after the performing of assays.

The toxicity assessment is based on in vitro and in vivo assays, however, it is a gap in the information obtained in the two analyses. So, with the aim of bridging the gap and in order to reduce the animal using enforcing a rapid screening of nanotoxicology, models with more reliable and a higher predictive value have been developed by researchers.

In this review are mentioned the main mechanisms responsible for nanotoxicity, as well as the factors that influence them that should be taken into account when designing and interpreting the nanotoxicity tests. The most frequently used experimental models will also be referenced, as well as the recent models introduced to characterize the NP toxicological profile, giving an overview of the positive and negative points of them.

Keywords: Nanoparticles. Nanotoxicology. Oxide Stress induction. Cell-based assays. In vivo models. Experimental analysis.

List of abbreviations and acronyms

8-OHdG	8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine
AgNPs	Silver Nanoparticles
AuNPs	Gold Nanoparticles
BBB	Blood Brain Barrier
BrdU	Bromodeoxyuridine
CNS	Central Nervous System
CNTs	Carbon Nanotubes
CoC	Cell-On-a-Chip
CuNPs	Copper Nanoparticles
DLS	Dynamic Light Scattering
EM	Electron Microscope
FeNPs	Iron Nanoparticles
Gpx	Glutathione Oxidase
GRed	Glutathione Reductase
GSH	Glutathione Reduced Form
GSSG	Glutathione Oxidized Form
HO[·]	Hydroxyl radical
LDH	Lactate Dehydrogenase
LPO	Lipid peroxidation
MS	Mass Spectroscopy
MTT	Tetrazolium bromide test
NP/NPs	Nanoparticle/ Nanoparticles
OoC	Organ-On-a-Chip
O₂⁻	Superoxide anion
PEG	Polyethylene glycol
PLGA	Poly Lactic co-Glycolic Acid
PC/PCs	Protein Corona/ Protein Coronas
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship models
ROS	Reactive Oxygen Species
SiNPs	Silica Nanoparticles
SOD	Superoxide Dismutase

TiNPs	Titanium Nanoparticles
TBTK/TD	Toxicity-based toxicokinetics /toxicodynamics
TD	Toxicodynamics
TEM	Transmitting Electron Microscope
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRI	Tumor necrosis factor receptor I
TK	Toxicokinetics

I- INTRODUCTION

Nanotechnology is a broad term, which involves a wide variety of methods, tools, and applications. In the literature, it is possible to find a diversity of definitions. The narrower define nanotechnology like the production and application of structures, devices, and systems by controlling the shape and size of materials at the nanometer scale. The nanometer scale ranges from the atomic level at around 0,2 nm up to around 100 nm. Therefore, nanotechnology is science, engineering, and technology conducted at the nanoscale ^[1].

In 2011, the European Commission considered nanomaterial as: “a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm - 100 nm ^[2].”

Since they were first introduced in the 1980s, nanoparticles (NP), have increasingly gained importance in medicine so since then there is an upsurge of nanomaterials to diagnosis, to treat and preventing diseases ^[3].

Nanomedicine is increasing in importance, owed to the fact that nanotechnology made it possible to achieve it: (i) an improved delivery of poorly water-soluble drugs; (ii) a targeted and controlled delivery of drugs in a specific type of cells/tissues or in intracellular aim; (iii) a co-delivery of two or more medicines for a combined therapy; and (iv) diagnostic imaging using nano-contrast agents selectively target for example to tumors, which can facilitate its localization. Furthermore, the simplicity of nanoparticle's manufacturing process enables easily scale-up ^{[4][3]}. Thus, in the turf of medicine, NPs are being more employable as a new delivery system for drugs, proteins, DNA and monoclonal antibodies. An example of the NPs commercialized for medical applications are silica nanoparticles (SiNPs) used as drug delivery; zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and titanium oxide nanoparticles used in sunscreens; and cooper oxide nanoparticles used in some intrauterine contraceptive devices, on account of its anti-microbial proprieties ^[5].

The unique proprieties of NP such as small sizes, large surface area to volume ratios and reactivity can promote their multiples uses, but also may induce toxicity as well ^[5], as described later on.

Even though the swift development of nanomedicine, only in 2004, Donaldson et al. mentioned the importance of nanotoxicology as subcategory of toxicology. Nanotoxicity is

referred to as the study of the adverse biological effects of the interaction between NPs and cell, tissue and organ ^[6].

The emergence of nanotoxicology was important, because the standard toxicological methods/assays are often inadequate to NP because of: the mechanisms leading to nanotoxicity are different between NP and common drugs; the specific behavior of NP in culture media and the interference of NP with the common toxicity assays^[7], as clarified later on this monograph. There is still a limitation and lack of understanding related to the potential interactions of NPs with biological systems, consequently, nanotoxicology is a maturing discipline yet. It is necessary to develop this area in order to progress in the development of safety NPs ^[8].

This literature review aims to discuss the current knowledge in nanotoxicology and their influence in the laboratory assessments. Along with this, put special emphasis on NP's characteristics, main mechanisms of nanotoxicology, as well as the new trends in the nanotoxicology lab analysis.

2- NANOTOXICOLOGY

2.1- Exposure route and Distribution

Currently, given the large variety of commercial products containing NPs, the human's exposure to the nanomaterials is unavoidable ^[5]. The NPs' entry route into the human body is mainly inhalation, ingestion and dermal absorption ^[8]. After the absorption, the NPs are quickly distributed throughout the body, on account of its small size and its extensive surface area that allows an easily achievement of the bloodstream directly or via lymphatic circulation ^[9]. NPs maybe metabolized in the liver and suffer a renal excretion. NPs smaller than 10 nm are rapidly cleared by the kidney ^[10].

Several in vivo studies, have been performed to assess the distribution of NPs after inhalation ^[11], oral exposure ^[11], skin exposure ^[12], and intravenous injection ^[13]. These studies show that depending on the exposure route, time, concentration, as well as on their characteristics, NPs can cross the lung, gut, skin, placenta and blood-brain barrier ^[13]. It was also observed that after inhalation and oral exposure NPs were distributed to the liver, heart, spleen, and brain in addition to lungs and gastrointestinal tract ^[5].

NPs can reach the central nervous system (CNS) by the presence in the bloodstream, in the lymphatic circulation and by its capacity to move along human's neurons, axons and dendrites ^[12]. So, after inhalation, ingestion, topical application and injection, some NPs can

reach the CNS and can cause neurotoxicity, after crossing the blood brain barrier (BBB) [8] [12]. Shrivastava et al. [14] showed the neurotoxicity effects of three oxide metal NPs, titanium dioxide NPs, aluminum oxide NPs and ZnONPs, after oral administration in mice, due to its accumulation in the brain which led to an increase of reactive oxygen species (ROS), as well as changes in the normal metabolism of neurotransmitters such as dopamine and norepinephrine leading to brain damage.

In short, regardless of the type of exposure and route of entry the NPs can cause toxicity in any organs affecting any human system. However, the organs/systems which are more correlated to nanotoxicity are the liver, blood system, kidney and respiratory tract special the lungs [8] [9].

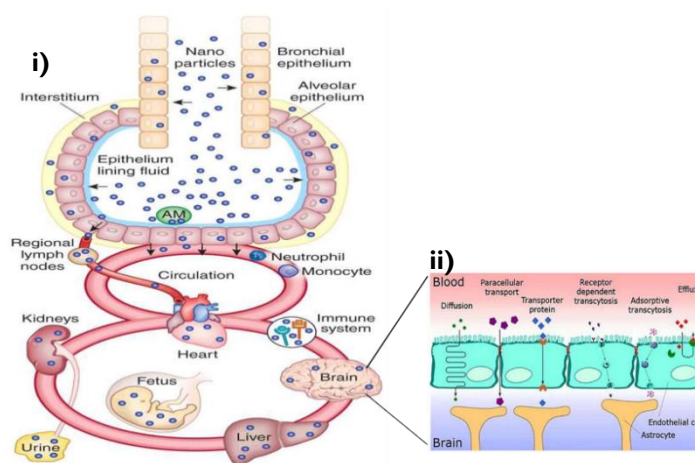


Fig. I - Representation of: i) the NPs distribution after oral exposure and ii) NPs' possible translocation mechanisms in the crossing of the BBB. Adapted from: (Shah, 2014) [9]

2.2 -Cellular NP interactions

Unlike any other chemical drugs/molecules, a single type of NPs causes toxicity by combining different mechanisms and not only by interaction with specific biomolecules. Some NP characteristics, contribute to their toxicity profile, this characteristic may undergo changes throughout the life cycle of NPs. Hence, it is important to determine the characteristics of the NPs before, during and after the toxicity tests [7].

The interactions between the NPs and cells may cause important cellular alterations, some of them are described in the following sections, and it is represented in figure 2.

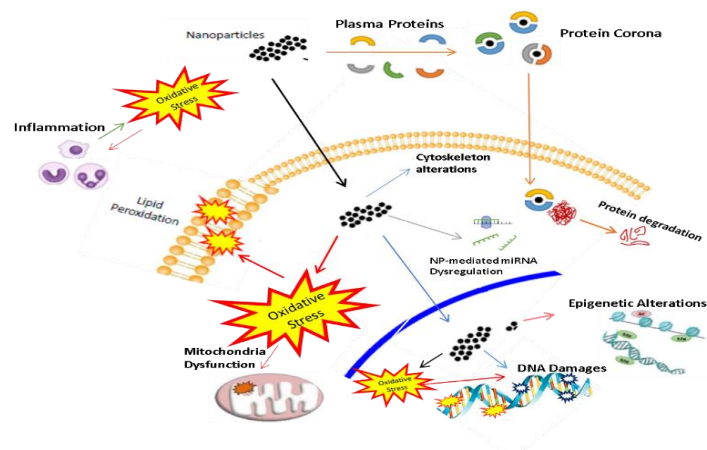


Fig.2- Representation of NP–cell interaction and the induction of cytotoxicity and immunotoxicity by the different mechanisms. Adapted from: (wong, 2017) [39]

A. Cellular uptake

Cellular uptake is a process that consists in transporting the NP into the cell, firstly occur the interaction between the NPs and the cellular membrane that sinks to form an endocytosis vesicle that “encapsulate” the NP inside, this way the NPs are transported it into the cell [15].

The NPs’ cellular uptake can occur by at least four pathways: phagocytosis, pinocytosis, caveolae-dependent endocytosis, and clathrin-mediated endocytosis [16]. Other types of endocytose, independent of clathrin and caveolin, are also related to cellular uptake of NPs. Each type of NPs generally exhibits a preferred pathway for its cellular internalization [15].

B. Cytoskeleton Alterations

The cytoskeleton is important to the cell because it is the responsible for: the spatial organization of the cell contents, the intracellular transport, the physic and biochemical connection with the external environment, and the movements and changes of the shape such as those involved in endocytosis[17].

Therefore, the change in the cytoskeleton by the NPs uptake, plays a central role in changing the cell mechanical properties, some studies have shown that internalization of NPs affect cellular proliferation and differentiation through cytoskeleton reorganization [18]. Thus, NPs has been reported to cause cytoskeleton alterations. The barium titanate nanoparticles, silver nanoparticles (AgNPs), iron oxide nanoparticles and walled carbon nanotubes (CNTs), are the most correlated with cytoskeleton alterations [18]

C. Productions of ROS

- ROS

The ROS correspond to a group which include: superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot}), hydrogen peroxide, oxygen and hypochlorous acid [19].

The main organelle related to the production of ROS is the mitochondria where occur the production of ATP by a sequence of proton and electron transfer reactions that finished in the reduction of molecular oxygen and formation of water, known as the mitochondrial respiratory chain. During this process may occur the formation and release of ROS lead to an increase of the oxidative stress. In addition to normal cellular metabolism, there are other mechanisms responsible for the generation of ROS, which could lead to damage in cells [8] [20].

The ROS levels play an important role in the cell because the ROS participate in the cell signaling, induction of mitotic responses, as well as in immune defense mechanisms. It is important to highlight also, the role of ROS in the formation of protein / protein disulfide bonds [17] [20].

- Cellular Antioxidant

Cellular oxidative homeostasis is guaranteed by cellular antioxidants [21]. The cellular defences against oxidative stress can be divided into non-enzymatic antioxidants such as (i) glutathione that have two form the reduced (GSH) and the oxidized (GSSG); (ii) thyroxine; (iii) carotenes and (iv) ubiquitin; and enzymatic antioxidants such as i) superoxide dismutase (SOD), which metabolizes the superoxide radicals in hydrogen peroxide; (ii) the catalase; (iii) the glutathione peroxidase (GPx); (iv) the glutathione reductase (GRed) which regenerates reduced glutathione in its oxidized form and (v) glutathione S-Transferase which catalyzes the association of GSH with various compounds and regenerates the NADPH group. All of the antioxidant enzymes actions and their cooperation are schematically represented in the figure 3 [20] [21].

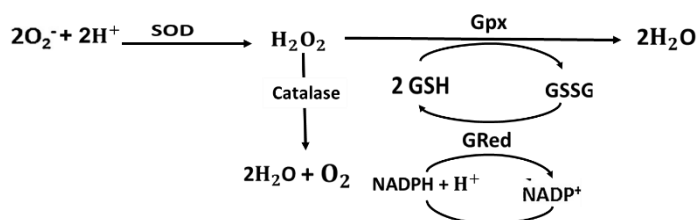


Fig.3- Schematic Representation of the antioxidant enzymatic reactions that occur in the cells. Adapted from: (Doktorovova, 2014)[20]

There are several studies that is evident the ROS increase by NPs interaction at the cellular level. For example, AgNPs have shown to lead to GSH depletion, as well as a slight inhibition of SOD which contributes to catapulting the toxic effects of ROS induced by AgNPs [8].

Wang et al. also investigated the toxicity of different NPs in catfish and primary human hepatocytes cells by carried out ROS assays. They found that copper oxide NPs and zinc oxide NPs showed significant toxicities having been evident the increase of ROS by the interaction with these NPs [22].

Doktorovová et al. performed a ROS production/determination/detection test with the 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate. They detected the possibility of the cationic solid lipid NPs cause oxidative stress in liver hepatocellular cells [21].

- Mechanism of NPs-induced ROS

One of the main causes for nanotoxicity is the ROS production, resulting in increased oxidative stress, lipid peroxidation (LPO), and inflammation [21].

Induction of ROS by NPs have already been observed in vivo and in vitro tests for a long time, e.g. Wang et al. [23] reported a GSH/GSSG ratio significantly decreased after intranasal exposure in the mice's olfactory bulb. The mechanisms responsible for this induction are diverse, and maybe due to: (i) the interference with redox active proteins [19]; (ii) interaction with organelles with a key role in the oxidative stress such as mitochondria. E.g. CNTs and the cationic polystyrene nanospheres, could reach the mitochondria leading to a increases of ROS [24]; (iii) chemical reactions of the coating by their reactive groups or ion release, that happen mostly in the acid environments of endo or lysosomes [7] and (iv) activation of signaling pathways due to NP-cell interaction [19].

The increase of ROS can lead to an intensification of oxidative stress that, therefore, can result in a series of pathological events like genotoxicity, inflammation, LPO, protein modifications, apoptosis, fibrosis and carcinogenesis [20] [21].

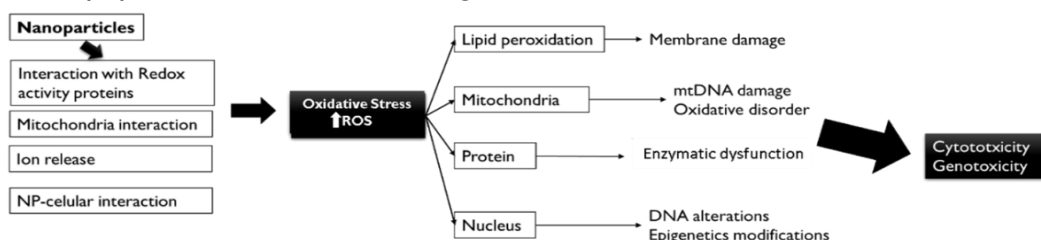


Fig.4 – NPs-ROS Mechanism and toxicity mediated by ROS generation

D. Lipid peroxidation

LPO can be described generally as a process under which oxidants attack some lipids, especially polyunsaturated fatty acids, resulting in the formation of the lipid peroxy radicals and hydroperoxides [19].

Glycolipids, phospholipids, and cholesterol are also known targets of oxidative modifications. The general process of peroxidation consists of 3 steps initiation, propagation, and

termination ^[25]. In response to lipid peroxidation according to the rate of peroxidation are activated signaling pathways that lead to an increase of antioxidant proteins in order to manage the oxidative modifications. When is overrunning the capabilities of repair the cells induce apoptosis or necrosis ^[26].

LOP is the oxidative degradation of the lipids in the membrane that can lead to a membrane damage and cell lysis. It was found that LPO can occur after the contact with titanium nanoparticles (TiNPs), copper nanoparticles (CuNPs), iron nanoparticles (FeNPs) and AgNPs owing to their reaction with membrane lipids leading to the oxidative degradation of this biomolecules resulting in tissue damage ^[19].

AKhtar et al. ^[27] reported, also, that at lower concentrations, SiNP, induced cytotoxicity by induction of ROS in the cell membrane leading to LPO and membrane damage.

E. Apoptosis

Cell death can occur by 2 different mechanisms necrosis and apoptosis. The apoptotic pathway is the one that is most related to the cytotoxicity of the nanoparticles ^[22]. Apoptosis can occur by different mechanisms, some of its maybe (i) by ROS induction which triggers the production of tumor necrosis factor (TNF) and tumor necrosis factor receptor I (TNFRI), TNF and TNFRI initiate apoptosis by activating procaspase and 8-caspase, that caused a release of cytochrome C that activates caspase-9 and subsequently activating caspase -3, -6, -7 resulting in apoptosis ^[28] (ii) NP can provoke damages in the DNA, this damages can lead to an activation of the apoptotic protein that migrates to the mitochondria leading to the release of cytochrome C ^[22]; (iii) the NP can induce the nitric oxide synthase to produce the nitric oxide that causes the lipid peroxidation of the mitochondrial membrane resulting in the cytochrome C release initiating, this way, the events which culminate in the cellular apoptosis and (iv) the NPs direct contact with mitochondria may cause a disturbance of its activity and an alteration of its permeability leading to its dysfunction and, therefore, the cellular apoptosis^[29].

It is important to mentioned, the mitochondria vital role in the apoptosis because it has the ability to control this mechanism through cytochrome c, calcium, and morphological changes ^[17] ^[29].

The studies indicated that the apoptosis in an intrinsic way is associated with toxicity of Zinc nanoparticles, CuNPs, TiNPs, AgNPs and SiNPs ^[29] ^[30].

Park E.J et al. ^[31] found that the cerium oxide NP provoke cellular death in human lung epithelial cells by the ROS increased, GSH decreased and induction of genes related to

oxidative stress. This study concluded that the cerium oxide NP exert cytotoxicity by an apoptotic process, because it was verified the activation of caspase-3 and chromatin condensation.

Andreani et al. refers to several studies where SiNPs have been shown to induce DNA damage, induce a release of TNF and nitric oxide. Their paper reported the increasing of the caspases activity, concluding this way that the cell death after exposure to SiNPs occurred mainly by apoptosis pathway ^[10].

F. Inflammation

Inflammation is a defense mechanism of the body that involves several regulatory molecules and signaling pathways. NPs induce the inflammation due mainly to the role of oxidative stress ^[19].

Aside from the release of pro-inflammatory mediators by oxidative stress caused by NPs ^[8]. The NPs are also associated with the inflammatory induction by the direct contact with immune system cells, such as macrophages and neutrophils, which after the NPs phagocytosis induce an inflammatory response that leads to an increase of toxic products, such as ROS and complement system proteins which have been shown to directly cause toxicity and promote cell death through the activation of apoptosis/necrosis ^[32]. Hence, that could be said that the oxidative stress and inflammatory response are reciprocally linked ^{[8][10]}.

Thus, the oxidative stress originated by NPs-induced ROS leads to the release of inflammatory mediators contributing to the activation of the pro-inflammatory cascade the activation of pro-inflammatory pathways leads to an increase of the levels of cytokine and interleukin. This mechanism was verified in vitro and in vivo tests for SiNPs ^[27]. Where this NP showed that the NPs-induced ROS leads to an activation of the pro-inflammatory response ^[32].

Inflammation has been shown to directly cause toxicity and promote cell death through the activation of apoptosis/necrosis and the induction of toxic products of inflammation, such as ROS and complement proteins ^{[32][8]}.

Activation of the inflammatory cascade involving pro-fibrotic mediators leads to fibrosis which is what happens with CNTs i.e. CNTs. in vitro and in vivo tests showing that, besides causing an inflammatory response in various cell types (alveolar and bronchial epithelial cells, keratinocytes, monocytes, and macrophages) they after inhalation and deposition on the pulmonary tract caused an inflammatory response that can lead to pulmonary fibrosis ^{[24][8]}.

G. Genetic material and epigenetic alterations

The interaction of NPs with the genetic material as well as the environment that its surround, can lead to changes in the genes as well as in the DNA expression [8].

NPs can lead to genotoxicity and epigenetic changes also, having consequences for DNA and its expression [33].

- Genotoxicity

Genotoxicity is any interaction not favorable, which is toxic to the genetic material. The damage caused by NPs result in wide ranging DNA lesions, which include single strand breaks, double strand breaks, intra/inter strand breaks, the formation of modified bases (thymine glycol, 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 8-hydroxyguanine) and genome rearrangements [8] [34]. The DNA lesions mediated by NPs may occur through NP-induced oxidative stress, which is the main mechanism of genotoxicity, but also, by NPs directly interaction with the DNA. The damages on the DNA, can lead to chromosomal aberrations, gene mutations, apoptosis, carcinogenesis or cellular senescence, if left unrepaired [34] [35], like is represented in figure 5.

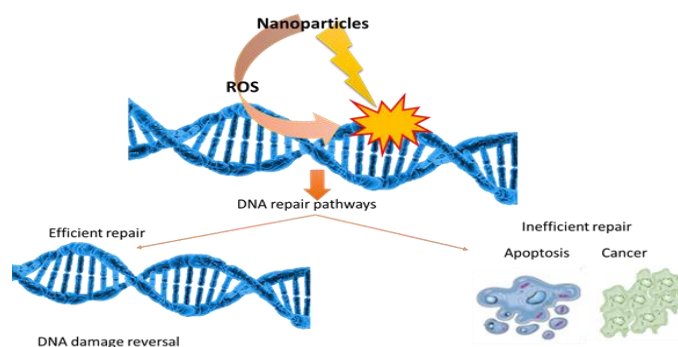


Fig.5 – Representation of the NPs-induced genotoxicity.

i) DNA ROS-induced alterations

Generation of ROS induced, directly/indirectly, by the NP plays an important role in genotoxicity. The DNA is one of the main targets of oxidative stress. ROS cause DNA damage by reacting with either the proteins that surround the DNA (e.g. histones), or with the DNA itself and could even lead to the DNA chain breakdown. OH[•] is known to react with DNA, leading to its cleavage by formation of the 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) DNA adduct [35] [8]. Thus, the 8-OHdG is used as a biomarker of DNA damage [35], such as explained later on. Several studies confirm DNA fragmentation and induction of adduct formation by the exposure to several metal oxide NPs such CuNPs, FeNPs, TiNPs, and AgNPs [34] [36].

ii) Directly NP-DNA interaction

NP with a diameter smaller than 5 nm can interact directly with DNA leading to genotoxicity^[7]. The direct contact it is difficult to happen and it is not very common reported just a few NPs can interaction with the DNA, the interaction can cause stalled replication forks, leading to mutations and genome instability^[37].

- Epigenetic alterations

Epigenetics is the study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence. Epigenetics encompass DNA metallization, histone modification and non-coding RNA^[38].

Since the first publication in 2008, the studies of epigenetic changes, caused by NPs are being increased. NPs are being associated to changes in DNA methylation. Theses alteration are related mostly with the cell-cycle and DNA repair^{[33][34]}.

However, the knowledge of nanomaterials' epigenetic changes is not deep yet, so it is necessary to perform more studies to know more about it and to conclude about its relevance in the nanotoxicity^{[10][39]}.

2.3- NPs' characteristics

As mentioned above, the physicochemical properties of NPS, especially the size and surface play an important role in its toxicology behavior. So, the NPs' size and surface, as well as other characteristics that are listed below are considered as important factors to NP's nanotoxicity^[9].

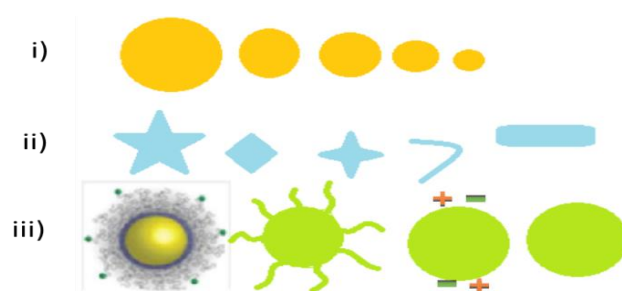


Fig.4- Representation of the NPs important characteristics.

Adapted from: (Shah, 2014)^[9]

i) Size

Like mentioned in this review, size is crucial for the biological action of NPs as well as for their toxicity. The very small size of the NPs allows them to penetrate easily through the cell membranes, which facilitates cellular uptake and interaction with the biomolecules, contributing to their toxicity^{[18][21]}. So generically, the amount of cellular uptake and consequently the nanotoxicity, decreases with increasing particle size^[9].

Boyoglu et al. ^[40] showed in a study with gold nanoparticles (AuNPs), with different sizes, that the smallest sized, 3 nm AuNPs, had higher cytotoxicity in Human epithelial type 2 cells. Nevertheless, it is not always like that, like was observed by Oh et al. ^[41] that reported the cellular uptake and consequently the toxicity is not linear with the NPs dimensions as observed that in one assay with titania silica NPs with sizes of 25 nm, 50 nm, 100 nm and 125 nm found that the 50 nm NPs had the greater cytotoxicity in macrophages. This fact had also been evidenced in the uptake of AgNP with different sizes, 15, 30, 75 and 100 nm, in human adipose cells where the 50 nm AgNP showed to be the one with highest uptake. This evidence may be due to the fact that for smaller particle sizes the NPs need to agglomerate before undergo to cellular internalization ^{[18] [12]}.

Overall, size has a big influence on cellular uptake and toxicity, however, it is not the only factor. Therefore, it is not possible to generalize about the relationship between the NP size and their uptake/cytotoxicity. ^[18] Although it is not a direct correlation between the small size and toxicity but it is a evident correlation between the higher surface area and reactivity that maybe or not be a “synonym of toxicity” ^[10].

ii) Shape

The different shapes of NPs mainly due to the surface coating so this can be easily manipulated in order to take the better advantage of them ^[18].

According to several studies it is concluded that the different forms of NPs influence their cellular absorption as well as their toxicity. For example: (i) Wang S et al. ^[42] found out that spherical AuNPs of different sizes are not inherently toxic to human skin cells, unlike nanorods that have been shown to be highly toxic; and (ii) McLaren et al. ^[43] found that the hexagonal form of ZnONPs nanocrystals had significantly more activity than the crystal form.

The influence of NPs morphology on cellular uptake and toxicity has mainly to do with the different cell-NP interactions that are constrained by the different NPs' shapes, and the fact that different shapes leads to different surfaces areas. The shape of NPs seems to directly influence the cellular uptake in the following order, from the highest to the lowest uptake cellular: rods/spheres, cylinders and cubes ^{[16] [10]}.

iii) Surface

The structure of the NPs plays an important role in its functions. Besides conditioning the morphology, it has an influence on the toxicity, stability and biocompatibility of the NPs ^[8]. Shi et al. ^[44] demonstrated that CuNPs, with different ligands on the surface coating, 8-

mercaptooctanoic acid, 12-mercaptooctanoic acid and 16-mercaptooctanoic acid, exhibit different oxidizing activities resulting in different levels of ROS.

In a recent study, with hybrid NPs containing poly lactic co-glycolic acid (PLGA) that were prepared by varying the amounts of interfacial water between the PLGA core and the lipid layer of the hybrid lead to different flexibilities. The more rigid NPs suffered greater uptake than the less rigid NPs, this evidence possibly due to the fact that during the internalization, the elastic deformations/flexibility can dissipate a superior energy in the interface NP cell and thus make the absorption more difficult ^[18].

In addition to the flexibility, the roughness seems to play an important role as well. Rough SiNPs showed higher cellular uptake than smooth NPs, possibly because the roughness increases the surface area, increasing this way the receptor-mediated endocytosis ^[18].

The surface coating composition determines the NPs' surface charge, which conditions the uptake and the interactions with biomolecules. NPs with positive charge surfaces seem to have a higher toxicity possibly because have a greater cellular internalization ^[18] ^[9].

The surface can be manipulated as a strategy to improve biocompatibility, decrease cytotoxicity and alter cellular uptake of NPs. The polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol, and zwitterionic linked molecules are used for this purpose. The PEG coating of oxide iron nanoparticles, for example, significantly reduced the uptakes by macrophages, by increase the biocompatibility ^[5] ^[18].

2.4 – Microenvironment-NP interactions

a) Aggregation, agglomeration and sedimentation

The aggregation and agglomeration influence the sedimentation of the NPs and also its contact with the cell altering the cellular uptake and cytotoxicity ^[7].

The NPs can form agglomerates and/or aggregates due to the search for a state with a lower free energy, which is promoted by its hydrophobic nature. In the agglomeration, the bonds are more fragile, easier to form and to break in comparison with the aggregation, where covalent bonds occur^[7]. The agglomerations are conditioned by various factors of both the medium and NPs characteristics. The pH, salinity, ion concentration and ionic strength of the medium influence the formation of agglomerations as well as the charge, size, and morphology of the NPs. ^[45] For example, nanorods and fibers have shown to originate more easily agglomerates than spheres ^[7].

Since most of NPs are unstable in biological fluids, it is believed that agglomeration/aggregation is an inevitable biological occurrence so it is important to pay attention to this mechanism when it is assessing the toxicity in vivo and in vitro^[7].

The impact of agglomeration/aggregation on cell uptake is also conditioned by the extent of agglomeration/aggregation, its size and the NPs cell uptake mechanism. For example, the endocytosis, mediated by clathrin and caveolin is conditioned by the NPs sizes for sizes greater than 80 nm this mechanism does not happen ^{[13] [21]}.

The cytotoxicity is conditioned, also, by agglomeration. For example, for CNTs there appears to have correlation between NP agglomeration and cell damage. Agglomeration, can, also, cause less cellular toxicity, because the agglomerate is less likely to suffer cellular uptake and it is difficult the directly interaction with some organelles like the mitochondria ^{[7][13]}.

b) Formation of Protein Corona

Protein Corona (PC) is no more than the binding of NPs to serum's proteins, coronas. The nature of this binding depends on the physicochemical properties of the NPs and the microenvironment that surrounds them ^[33]. When NPs contact with the biological fluids, they are quickly covered by proteins, forming the PC. The proteins present in the biological fluids that had a higher susceptibility to PC formation are those that are involved in the: complement system, blood coagulation, and foreign body recognition ^[46]. For example, albumin, immunoglobulin G and fibrinogen are very present in the PCs. This formation affects the distribution, pharmacokinetics as well as the circulation time of NPs in the body ^[47].

There is no doubt about the important role of PCs formation in the NPs toxicity and immunogenicity, but the correlation between the formation of PC and toxicity/immunogenicity is not defined, because some PCs formation can be beneficial, increasing the stability and diminution the toxicity of NPs, and others hand can be detrimental because it leads to a rise of toxicity/immunogenicity ^[46]. So, this depends mainly on the characteristics of NPs and its mechanism of toxicity. The benefits of the PC formation are predicted by the decrease in the reactivity of the surface of NPs, by masks the NPs surface decreasing the toxicity, that can impede the direct contact between NP-cell, e.g. the CNTs have proven cytotoxicity activity, but binding to blood proteins, forming the PC, has been shown to reduce the toxic effect, which is mainly because the formation of PC protect the cells from direct contact with the CNTs' surface ^{[18] [47]}.

A study by Paoli et al. ^[47] demonstrated that the interaction of CNTs with platelets, strongly depends on each proteins has been part of the PCs, may even have opposite impacts.

The albumin decreases aggregation with platelet the histones and gamma globulins cases platelet aggregation and fragmentation, respectively.

The formation of PC when the NPs have positive charges appoint to an increase of toxicity because the corona is degraded in the endo/lysosomes and the re-expose the positive charge induce this way lysosomal damage, leading to cytosol release of lysosomal content, and possible contributing to cellular apoptosis ^[48].

Summarizing the formation of PC, it contributes negatively or positively to nanotoxicity. Negatively because of the possibility to increased biocompatibility, decreased cell adhesion and decreased of the free energy. Positively because of the Pcs conformational changes, possibility to activate immunogenicity, and lead to lysosomal injuries. Moreover, depending the PC formed, NP-Corona can increase or decrease of the NPs' toxicity ^[46] ^[48].

2.5- NPs Characterization

As highlighted above, it is necessary to characterize NPs in terms of both purity and physicochemical characteristics such as: morphology, chemical composition, microstructure, particulate size distribution, surface area etc. Not only to obtain a static picture of the NPs, but a dynamic characterization that considers the biological environment and that evaluates the NPs before, during and after the contact with biologic systems, considering its properties of the surface as well as the integrity ^[9] ^[49]. The parameters necessary to take into account are mainly the surface charge, surface area, and size/morphology. It is important also important to evaluate the interaction of NPs with the cells, in the following points are described some of the techniques used in these determination ^[10]. In annex I it is a table with the different methods for cell-nanoparticle analysis.

I. Size, morphology and cellular localization

As the above discourse is imperial the determination of the NPs characteristics, so, it is essential the determination of its size and morphology. This determination it is achieved by the recourse of several methods that, may, due to high resolution, allow the visualization of the NPs. These methods may also be performed to verify the cellular alterations after NPs cellular uptake as well as their cellular location. In the next few points, some technical these are discussed ^[10].

- Electron Microscopy

The electron microscope (EM) is used to determine the characteristics of the NPs, because it has a very high resolution that allows visualizing one simple NP. The EM requires vacuum, so, the sample needs a long process of preparation dehydration and fixation leading.

This technique is widely used to analyse the characteristics of NPs like the shape, the size and cellular localization of the NPs because it is the only microscopic method capable to visualize a single NP in cells^[49].

There are two types of EM that allows to visualize the cellular morphologies alterations by the contact with NPs. The (i) scanning electron microscope is based on scattered electrons and the (ii) transmitting electron microscope (TEM), first introduced by Peckys and Jonge is based in transmitted electrons, and allows to a visualization of the NPs in samples with live cells^[50]. Since TEM provides a higher resolution it is successfully used to estimate the mean size as well as the size of NPs^{[49][50]}.

- Other techniques

The fluorescence microscopy makes possible to locate the NPs at the cellular level, but it is necessary that the NPs emits fluorescence or are tagged to emit^{[7][49]}.

The micro-Raman microscopy uses a monochromatic laser which obtains an it is powerful bioanalytical method which can provide substantial information regarding the chemical composition of a single cell^[49]. Using this microscopy Dorney et al.^[51] could map the location of NPs demonstrating the potential of this technique to unambiguously identify and locate non-fluorescent NPs in cells and to find it. Therefore, it seems to be a good alternative to others spectroscopy technics.

- Dynamic Light Scattering

The Dynamic Light Scattering (DLS) is used to determine NPs' size distribution in suspension /solution based on the Brownian motion that gives indirectly the NP's size. This technic, however, has a limited use in liquid samples because it suffers from interactions of proteins, e.g. serum proteins. To overcome this problem, other methods are nowadays developed such as fluorescence single particle tracking, which allows the determination of size distribution in undiluted biological fluids^[52].

II. Charge

The zeta potential refers to the electrical voltage difference between the surface of each particle and its liquid suspension, indicate this way the charge of the NPS and be a key indicator of the stability of the NPS in the surrounding medium. At present, the measurement of the zeta potential is automated^[50].

Nanoparticles with a zeta potential between -10 and +10 mV are considered approximately neutral, while nanoparticles with zeta potentials of greater than +30 mV or less

than -30 mV are considered strongly cationic and strongly anionic, respectively. Since most cellular membranes are negatively charged, zeta potential can affect a nanoparticle's tendency to permeate membranes, with cationic particles generally displaying more toxicity associated with cell wall disruption ^[53].

The higher are the zeta potential, more stable in the middle and the less tendency to aggregate will be the NPs in the medium ^[50].

III. Specific surface area of NPs

The specific surface area of NPs can be calculated by using the Brunauer- Emmett- Teller theory, that was developed by Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett and Edward Teller. This theory allows, based mathematical theory and physical adsorption of nitrogen on the surface of the material, to calculate the surface area in terms given in square meters per gram, m²/g ^[54]. It is important to take in consideration the surface area units of measurement, and should be considered an argument ^[7].

IV. Quantitative analysis

Many techniques are performed in order to quantification of the NPs they are chosen to take in account mainly the properties of NPs.

Mass spectroscopy (MS) are widely used to quantify NPs. During the last years, the MS have been improved to an optimization of the analysis of a single cell like inducibility coupled plasma MS, laser desorption ionization MS, among others. By using the MS analysis, it is also possible to determine the coating surface constitution of NPs ^[49].

3- NANOTOXICITY ASSESSMENT

NPs are special entities that can easily suffer alteration of their proprieties by interacted with the environment leading to a complete different toxicity. Therefore, in the design of a nanotoxicity assessment should be considered several aspects, with the main purpose of avoiding the underestimated and/or overstated estimates of toxicity ^[9].

So, it is essential the determination of NPs characteristics before any assay not only because of their importance in toxicity by for allowing a comparison between results of different studies ^[7]

The assays that are often used in bulk substances cannot be used for NPs or must undergo adaptations/changes to be used. Due to the special characteristics of some NPs like: (i) the optical capacity; (ii) ability to interact with enzymes or enzyme substrates due to their absorption capacity; (iii) the magnetic properties; and (iv) their capacity of pH alteration may

either interfere with assay materials or detection system ^{[7][55]}. So, it is important controlled the possibility of NP interference with the assays, for this control, it is imperative that before any assay is performed, the model undergoes a validation, not only with positive and negative controls but also a positive control combined with NPs, i.e. performance an interference assay ^[56]. Since the NP's characteristics are a huge issue, it is important to determine those in the first place, followed by in vitro and In vitro tests. In annex 2 there is a table where is mentioned examples of In vitro/In vivo studies on toxicity of NPs.

3.1- In Vitro models

The researchers are pointing out efforts in the development and optimization of in vitro methods for the evaluation of nanotoxicity, trying to make them mimic as much as possible what happens in vivo ^[13], due to the fact that the in vivo tests are time-consuming, expensive and subject to ethical concerns,

This assay gives a critical information especially about the mechanism behind toxicity. These methods use a cell culture that after being exposed to NPs, are evaluated for toxicity. The methods are faster, more sensitive and repeatable and with less variables ^{[56][57]}.

Data indicate that cellular uptake and toxicity are influenced by the: (i) level of cell differentiation and (ii) cellular communication ^{[18][7]}.

I. Cellular Models

The in vitro tests use cellular models, which should be chosen considering the information about the principal route of exposure and the bio-distribution of the under-studying NPs ^[57]. The ideal cellular culture would be a primary culture of human tissue cells of the NPs' exposed organ. ^[56]

The choice of cell lines generally depends on the application of NPs and the expected in-vivo target tissue ^[56]. E.g. in Vicente et al. ^[58] the toxicity of AgNPs used in a transdermal device was evaluated in vitro using human dermal fibroblasts.

However, the cell models used are restricted to what is available on the market, which principally are cells with high proliferation capacity isolated from biological samples such as blood. Thus, in the forefront of used cell models used are the tumor/mutated cells, which due to their high proliferation rate and long-life time make possible a good yield to the test, although, these are not the ones that best mimic what happens in vivo ^[57].

By selecting the cellular model, it is necessary to take into consideration the cell type, the culture medium and the number of cells that are needed, because like as discussed above these are factors that influence how the NPs' behaviors ^[56].

In the following points, the different characteristic of the in vitro cellular models which influence the nanotoxicity assessment are deepened, such the differentiated cells types.

- Types of Cells

The types of cells influenced the NP's cellular uptake as well as their toxicity, what means that NPs might be toxic for some cells and not for others.

It is believed that the variation of nanotoxicity with the cell type may have to do with: (i) physiological function of the cell e.g. macrophages and monocytes are cells that have the function of defense, they seem to be more susceptible to nanotoxicity ^[21]; (ii) cell proliferation capacity ^[7]; (iii) phase of the cell cycle in which the cell is found, the G2 / M phase is where the cellular uptake is considered to be higher ^[21] and (vi) the cellular level of antioxidants, as the main mechanism of toxicity is the generation of ROS, cells' that have higher levels of antioxidants suffering less of nanotoxicity ^[18].

The cell types also have an influence on the NPs cellular uptake mechanism as well as the extent of that uptake. For example, cancer cells, widely used in in vitro toxicity tests, have shown higher cellular uptake and greater sensitivity to nanotoxicity than primary or long-lived cells ^[7]. Hanley et al. ^[59] study demonstrated that human lymphoma T cells were more sensitive to ZnONPs than human primary T cells.

The different uptake and toxicity shown by the NPs in the different in vitro cellular cultures maybe a contribution to the in vitro-in vivo gap, so it is needed to advance a special care while choosing them ^[7] ^[56].

- Cellular communication

In the organism the cells communicate. The crosstalk between cells is important for cellular homeostasis as well as for immune and inflammatory responses. So, it is important to take into account this mechanism when it is being design or interpreted the in vitro assays ^[9].

Monocultures are often used to study toxicity, even though this model does not replicate what happens in vivo ^[57].

Alfaro-Moreno et al. ^[60] evaluated the effects of NPs in different combinations of cell lines and found out that after the contact with NPs, occurred different cytokine productions,

depending on the combinations of cells. This difference was correlated with the fact that there are different receptors on the cell surface depending on the crosstalk between the cells.

In short, it is important to considerate the possibilities and the importance of the cross-talking before taking any conclusions on NPs as toxicity ^[7].

The single cell models give the true functioning of the cell without the interference of cells' neighboring ^[9]. This is particularly important to truly evaluate the behavior of the cell without the possibility of these being obscured up by the population of cells. As well, the one-cell culture, permit the distinction between a smaller response of homogeneous population from a large response of small subpopulation ^{[9] [57]}.

Ideally a small population of cells, co-cultures, should be used. Because these models provide a sensitive, dynamic and rapid information on the toxicity of the NPs ^{[61] [56]}.

The optimization of the existent single-cell culture and multicellular culture to achieve a more quickly toxicity assessment and a screening of the toxicity of NPs made some groups of researchers develop a type of chip, cell-on-a-chip (CoC) and organ-on-a-chip (OoC) to evaluate the nanotoxicology ^[9]. The chip is a biosensor which can provide a rapid, real-time, evaluation of the NPs behavior. This test allows to faster results, and easier usage, a multi-sample analysis and a continue monitorization of NP cytotoxicity. However, even there is already a pipeline of CoC and OoC, its use in nanotoxicology assessment still is unusual ^{[61] [62]}, in annex 3 and 4 its represented a CoC and OoC, respectability.

II. Cellular Microenvironment

- Flow vs Static

As already mentioned, the state of agglomeration/aggregation and sedimentation of the NPs have an influence in its uptake as well as in toxicological effects. The sedimentation has been observed that does not occur in vitro, then systems that do not allow this event were developed such (i) inverted models and (ii) flow and microfluidic models ^{[7] [55]}.

(i) Inverted models, in contrast to the vertical view setting, has an invert configuration, so, cells are not placed in the bottom of the well. These are cultured in an inserted at the top of the medium, reducing this way the possibility of sedimentation ^[7], represented in figure 6.

Cho et al. ^[55] observed that using this model the cellular uptake was smaller than normal. This difference was verified for NPs with great potential to sediment underscoring the need to avoid sedimentation.

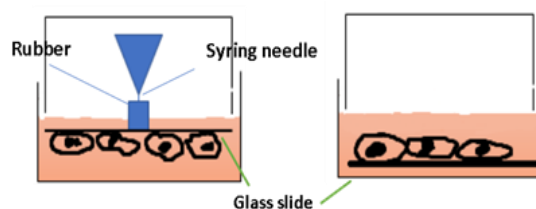


Fig.6- Scheme of the vertical (left) and inverted (right) configurations to measure the cellular absorption of nanoparticles. By the comparison between the models, it is possible to measure the impact of the sedimentation on the uptake.
Adapted from: (Cho, 2011) [55]

(ii) Flow and microfluidic models are more complicated models. In these models, the gravitational action is prevented and/or completely avoided. The flow allows a better distribution of NPs and a controlled contact time between NPs and cells. The application of this models into cellular culture ensures a dynamic model which is more similar to in vivo [7][9].

The application of flow implies a continuous renewal of the medium that allows guaranteeing a sustainable supply of nutrients as well as a constant pH [7].

In several studies, the NP uptake was compared under flow and static conditions and typically found higher uptake levels under static conditions, due to the contribution of NP agglomeration and sedimentation. However, it is not possible to generalize because fluid flow can provoke alterations in cell morphology and in cellular function so might, in contrast to the general findings, the flow condition can result in enhancement of NPs uptake [7][55].

In the toxicity, there are not many studies that compared the static and the fluid model, but since there are differences in the uptake, it is almost a certainty that the same happens with toxicity [7], so it is important to take into account if the models are static or not, during the design and interpretation of in vitro assays [9].

- There-dimensional vs two-dimensional

The two-dimensional environment, the classic cellular culture, not represent the there-dimensional environment that is present in vivo. Even the results of nanotoxicity can vary widely when they are obtained in a 2D or in a 3D environment. The 3D models consist of different types of cells in a 3D matrix, these models have been developed mainly to mimic the different tissues of the biological barriers such as the lungs, liver, and the brain. The formation of this models opens the way for the use of the artificial organ in the screening the toxicity of NPs [62] [56].

The benefits of 3D models are the similar with in vivo and long lifetime, however, it is more expensive and requires a demanding control of the environment [7].

The 3D models will gain more importance in the future since the use of these may be able to reduce the animals' use in toxicity assessments. However, in order to generalize the use of 3D models, these models must undergo maturation by the comparison with in vivo studies^[13].

Some 3D models have already been used for assessing the nanotoxicity. For example, (i) Wils et al.^[63] evaluated the nanotoxicity of NPs using the 3D skin model EpiDerm™. In this study SiNPs, in contrast with 2D models test results, the SiNPs didn't show cytotoxicity. This evidence may be related with the less penetration/absorption of the SiNPs in the 3D model because of the physical barrier effects prevent the exposure of SiNPs to the basal cells, the model can be seen in figure 7; (ii) Muoth et al.^[64] used a 3D-Culture microtissue model of the human placenta to do a nanotoxicity assessment. The model was considered a better recreation of the in vivo, being suitable for a rapid evaluation of the acute toxicity and hormone secretion levels after exposure to different NPs, and also, holds for evaluation of the penetration and the cellular uptake mechanism, in annex 5 it is a representation of this model.

The use of 3D co-culture models and co-culture combined with dynamic flow provide the opportunity for designing a bridge in vivo-in vitro gap, however, have not used on yet as a routine method for nanotoxicity assessment^{[9] [62]}.

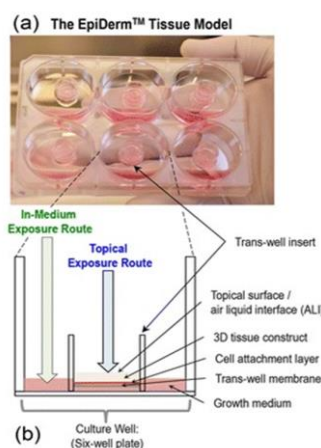


Fig.7- 3D skin model, (a) Six-well plate containing MatTek Corporation's 3D epidermis (EpiDermAL) tissue models in trans-well inserts. (b) Schematic diagram of a single well.

Adapted from: (Vicente, 2017)^[58]

3.2- In Vitro Assays

After incubating the NPs with the cell cultures, usually from 3 to 48 hours, the induction of toxicity is evaluated using biochemical assays, fluorescence, spectrophotometry

and others. The possibility of upscaling and atomization of these evaluations make then convenient one screening approach [7] [56].

The following points refer to the most commons nanotoxicity in vitro assays. These assays are mainly performed in order to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress and inflammatory induction by NPs [57].

I. Cytotoxicity

Exposure to NPs may result in a loss of viability for the exposed cells. The rate of cellular metabolism, membrana integrity, apoptosis/necrosis / cell death, and proliferation rate are the properties of the cells used that inform cytotoxicity [56].

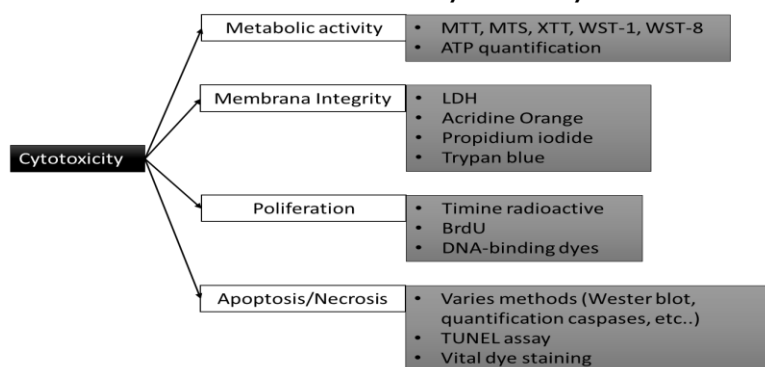


Fig.8- Representation of commonly used in-vitro assays for cytotoxicity assessment of nanoparticles

- Rate of cellular metabolism

The rate of cellular metabolism can be estimated by assessing the activity of mitochondrial enzymes. This is done mainly by colorimetric tests based on the Triazolic dyes [57]. In normal condition, these dyes suffer mitochondrial reduction by enzymatic cleavage. The tetrazolium bromide test ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) (MTT) consists in a reduction of the tetrazole ring, the dye is cleaved and transformed into a blue/purple compound, formazan (E, Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan) that is an insoluble salt. This reaction only occurs in metabolically viable cells by the mitochondrial enzymes. The amount of formazan formed reflects the rate of cellular metabolism and its amount is proportional to the number of viable cells. The quantification of the formazan formed is done after solubilization and standardization using spectrophotometry [56] [57] [36].

In order to avoid this intermediate step, the solubilization that happens with MTT test, can opt to use the recent tetrazolium reagents, the second-generation, such MTS, XTT, and the WST, that after being reduced by viable cells generated a formazan product that are directly quantified [56].

- Membrane Integrity

The membrane is important to ensure cellular homeostasis by acting as a barrier between the external and internal environment. The integrity of the membrane is a requirement for cellular viability and can be determined using chemical agents that only in case of damage, can be found inside the cell an example of this test is (i) propidium iodide, which is a fluorescent dye that cannot cross the cell membrane when it isn't damaged so that when it is damaged the dye will color the cell ^[56]; (ii) trypan blue. The determination of the lactate dehydrogenase (LDH) in the medium indicated cell damage ^[56] ^[36].

- Cellular proliferation

Cell proliferation also gives insight into cell viability, which can be assessed using several methods including histochemical and immunohistochemical approaches ^[56].

One of the histochemical approaches consists in the incorporation of radioactive thymidine into the DNA of the cells. This incorporation occurs during the proliferation in the phase S of the cell cycle at the replication of the DNA. Therefore, the evaluation of the presence of radioactive thymidine enquire about the cellular proliferation ^[57].

Like the incorporation of radioactive histidine is an expensive process and which requires a long incubation time and maybe toxic to cells, other alternatives can be used, for example the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU), 5-bromo-2'-deoxyuridine, in freshly formed cells the presence of BrdU can be detected using specific antibodies or by flow cytometry ^[56].

Immunohistochemistry for the evaluation of cell proliferation consists in the use of antibodies that detect proteins released only during cell proliferation, such as Ki-67 that is found only in dividing cells ^[56].

- Cell death

The cell dies by apoptosis and/or necrosis because these mechanisms evaluated during in vitro toxicological assessments ^[57].

Mitochondrial function plays an important role in the onset of apoptosis since it is the release of proteins present in the mitochondrial membrane that initiate the apoptosis mechanism. One of these molecules is cytochrome C, which when released into the cytosol leads to the activation of caspases 9, 7 and 3 that are proteases associated with apoptosis ^[56] ^[36]. Thus, the activity of these enzymes, caspases can be used as a biomarker for apoptosis. There is already kits in the market, which evaluate the activity of these enzymes. These kits

consist in a peptide susceptible of being cleaved by a caspase, this peptide is marked with a probe that emits fluorescence or changes the color ^[57] .

During apoptosis occurs the condensation of chromatin and fragmentation of the DNA by digestion leading to the formation of fragments. So, the detection of these can be employed for determining the initiation of apoptosis, during in vitro toxicity tests using DNA-laddering techniques such the TUNEL assay. The TUNEL assay detects the DNA fragments by binding to the fragmented ends of the DNA this bond is tagged so it can be detected ^[56].

A substantial amount LDH is leakage in to the cell medium after cell damage ^[5]. The LDH is a good biomarker of cell death once it is soluble in the culture medium, its presence indicates the occurrence of cell damage and can be detected by colorimetry taking advantage of the reducing properties of LDH. In the market, there are some commercial kits to detect LDH ^[57] ^[60].

Neutral red is a cheap and quick assay, in which the neutral red dye is placed in the culture medium being incorporated by cellular lysosomes where it accumulates. The absorption of this dye depends on the ability of the cell to maintain the pH gradients, which only happens in living cells. This thus allows determining whether the lysosomes are intact and consequently if the cell is alive, via colorimetry ^[65].

II. Oxidative Stress

One of the main mechanisms as already being described of nanotoxicity is the increase of ROS that leads to an oxidative stress, so their determination is important to evaluate the nanotoxicity ^[21]^[20].

The evaluation of stress oxidative can be done by several approaches: (i) use of fluorogenic dye that measures hydroxyl, peroxy and other reactive oxygen species (ROS) activity within the cell for examples: MitoSox, C11-Body and the 2',7'- dichlorofluorescein diacetate^[57]^[20] ; (ii) detection of the oxidation products, for example the detection of malondialdehyde resulting from LPO ^[56]; (iii) determination of the antioxidant enzymes activity such SOD, and presence of antioxidants such GSH ^[9]^[21]. The (i) and (ii) are more used because the enzymes undergo induction so the interpretation of their activity becomes difficult, because the increase the antioxidant activity and number of can be correlated to an increase or decrease of oxidative stress ^[57].

III. Inflammatory Response

To predict whether NPs impact on the inflammatory response we resorted to the evaluation of the production of inflammatory cellular mediators. The production of proinflammatory cytokines such as interleukin (2, 8 and 6) and the tumor necrosis factor alpha etc. works as in vitro biomarkers. The detection of the cytokines is being done by ELISA ^[57] ^[56]. However, it has been found that cytokines could be adsorbed on the NPs' surface, and NPs could increase the inflammatory response because of the fact of the NPs being non-sterility, so, like is mentioned above is important to evaluate the NPs characteristics and to pay attention to the cellular model in order to have a realist assessment ^[56].

IV. DNA alterations

NPs are described in countless non-clinical trials as DNA modifiers, and epigenetic modifier.

The genotoxicity can be evaluated by several methods such as: (i) the evaluation of the oxidation of the DNA can occur directly by the determination of the presence of oxidized bases. The oxidized guanine 8-OHdG is a biomarker to DNA oxidation and can be measured by immunohistochemistry or high-performance liquid chromatography ^{[21][9]}; (ii) the COMET assay consists of electrophoresis, single cell gel electrophoresis, which allows verifying the rupture in the DNA. The COMET is based on the principle that the different fragments of DNA migrate different distances in the gel according to the length. So, the more fragments the DNA has largest will be the "comet" tail, which is visualized after electrophoresis with the use of fluorescent dyes ^[36]. The limitation of this assay is that fragments of very small and mitochondrial DNA are not detected ^{[9][57]}; (iii) AMES test aims to determine genetic mutations using several strains of the Salmonella typhimurium and of the Escherichia coli ^{[66][66]}.

Alterations of epigenetics as well as of genetics can lead to "silent" changes, alterations in the gene expression and in the presence of proteins. Thus, the verification of genetic and proteomic alterations gives important information about the NP genotoxicity an epigenetic alteration profile ^[68].

The techniques used to evaluate the genotoxicity and epigenetic alteration include Northern blot analysis, Western blotting ^[57], real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) ^[9] and RT-PCR array ^[9] and proteomics that is evaluated by mass spectrometry ^[68].

3.3- In Vivo methods

In vivo studies are performed using in vivo/animal models are more expensive, time consumer and raise additional ethical concerns, however, they give a critical information especially about the bio-distribution of the substances ^[57].

In order to minimize the use of animals in the toxicity tests, Russel and Burch proposed the concept of the 3R's that encompasses: Replace - replace whenever possible the use of animals by other alternative techniques; Reduce the number of animals used as little as possible and Refine the way the experiments are performed to ensure that the animals suffer as little as possible^[7]. This concept, ethical criticism and the need for less costing-effective testing led the European commission to develop guidelines for standardization the in vitro testing ^[57]. Thus, the Registration, Evaluation and Administration of Chemicals, regulations define:(i) for the situations the in vivo tests can be used; (ii) the number of species; and (iii) the procedure to be carried out in each test^[7].

These assays allow obtaining vital information related to the NPs' safety ^[57]. Depending on the potential application of the NP or exposure to this, the assays are selected. In the following points, some of these models are referenced.

I. *Zebrafish Larvae*

Zebrafish Larvae are an in vivo model that have low cost, no need for sophisticated infrastructures, have small dimensions, a short life cycle, a fully sequenced genome that show a homology to the human genome, and it is transparence allowing the observation of the organs by using a simple microscope. Which makes it attractive to use this model ^[69].

Many studies have validated the use of *Zebrafish larvae* and *embryo zebrafish* as a model for assessing cardio-, hepatic- and neurotoxicity ^[69]. This model is being used to evaluate the toxicity of NPs in order to categorize the different nanoparticles in different levels of toxicity ^[69].

Zebrafish Larvae is used as an in vivo model to tests the following toxicities: (i) cardiotoxicity; (ii) hepatotoxicity, (iii) co-morbidity cardio and hepatic and (iv) neurotoxicity. Evaluated by the tests to the different behaviors of *zebrafish* embryos and larvae *Zebrafish* adult when exposed and not to the NPs ^[70].

II. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans is a Rhabditidae family nematode measuring about 1 millimeter in length is a well-known model, that has been used recently to evaluate the effects of several

types of NPs, especially the genotoxicity ^[71]. This animal model has been successfully used, by Ahn et al.^[71], for example, to evaluate the SiNP toxicity on DNA and on oxidative stress.

The use of this animal model for the evaluation of toxicokinetics (TK) and toxicodynamics (TD) parameters, which are typically evaluated in mice, was first performed by Yang et al. who introduced toxicity-based toxicokinetics /toxicodynamics (TBTK/TD) in *C. elegans*. In Yang et al.^[72] study the TK and TD parameters for zerovalent iron nanoparticles was determined, and in this study it was concluded also that the use of TBTK/TD in *C. elegans* could effectively replace the traditional use of mice, leading to a rapid assessment of toxicity, thus serving to rapidly select NPs more likely to cause toxicity in larger animals.

III. Others

Other “in vivo models”, mostly rats are used to nanotoxicity in vivo assessment. Some examples of the use of in vivo models are: (i) the evaluation of ocular toxicity of NPs in optical formulas. Eg. recently, the study by Rathod et al. used rabbits to perform the Draize test which allowed the assessment of eye irritation of NPs impregnated in an ocular insert ^[73]; (ii) the evaluation of pulmonary toxicity in rats; and (iii) the evaluation of immune cell distribution in mice ^[7].

4- BIOINFORMATICS

Bioinformatics is a hybrid science that links biological data, obtained by data-generating sources (eg. DNA sequencing), with techniques for information storage, distribution, and analysis for supporting multiple areas of scientific research. It is not widely used in nanotoxicology assessment essentially because of the lack of experimental data. Nevertheless, it is beginning to turn out such as described in the following points ^[74].

4.1- Sedimentation, Diffusion and in vitro Dosimetry model

The use of bioinformatics to determine biokinetics as well as the toxicity profile of NPs has been developed in recent years.

The starting point for the use of bioinformatics in nanotoxicity was given by Hinderliter et al. ^[75] in the development of Sedimentation, diffusion and in vitro dosimetry model (ISDD). This is a computational model that allows the evaluation of the sedimentation, diffusion and the target cell dosimetry of the NPs. However, some debates have been raised regarding the applicability of this model, mainly due to lack of data

4.2- Quantitative Structure-Activity Relationship models

Computational nanotoxicology, more precisely, the quantitative structure-activity relationship models (QSAR) have received a special attention because it helps to evaluate the biological effects of NPs. The QSARs will allow to predict the toxicity of newly designed NP from its physical-chemical properties, thus enabling a faster evolution of nanotechnology once safety is assured ^[7].

However, in order to obtain a reliable model, it is necessary to find clear correlations between the physicochemical properties of the NPs with the observed effect. For this, it needs to perform large-scale studies, and require reference's NPs to the QSARs, this NPs need to have a clear biological action ^[76]. Although there is insufficient data to create a QSAR that allows predicting the adverse effects of any NP in the human organism ^[76]. It has already been developed by Puzyn et al. ^[77] a QSRA that predicts the toxicity of metal oxide NPs in E. coli based on the effect of 17 different metal oxide NPs. Therefore, it is only a matter of time until QSRA for the assessment of human genotoxicity appears.

4- CHALLENGES AND CONCLUSIONS

Although there is already a more in-depth knowledge of NP toxicity like the main mechanisms responsible for triggering the adverse response, the advances in nanotoxicity have not been able to keep up with the development of nanotechnology since the input of new nanomaterials exceeds the ability to evaluate them in terms of toxicity. As each NPs is an entity with different behaviors in biological systems, a detailed study of the NP-cell/tissue interactions is necessary. It should be noted that a minor change in the physicochemical characteristics of NPs leads to a great impact in terms of their interactions with biological systems.

In order to be able to carry out a rapid and robust screening of NP toxicity, it is necessary to obtain more specific, discriminatory in vitro models that mimic as much as possible what happens in vivo. The emergence of flow models, co-cultures and 3D cell cultures is already an important step in this direction, however, optimization is required as well as the exploration of the combinations between models to get the largest of the models.

Of all the new models mentioned, it is important to highlight the 3D models that opened the door to NPs screening, allowing a non-animal toxicity screening; and the use of chips that not only facilitate the initial screening of nanotoxicity but would also improve access to and participation in assessment of nanotoxicity.

Thus, it seems that in the future should be achieved an international agreement on the nanotoxicity assessments involving its methods and procedures. Also, more studies especially in vivo and take in consideration the prolonged exposure to NPs should be performed, because like is a new subject it is still a deficit of information.

It is necessary to mention that despite all the nanotechnology is a promising area where the NPs benefits are much larger than the adverse effects that may be associated with it.

5- BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Satalkar, P., B. S. Elger, et al. (2016). "**Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter?**" Sci Eng Ethics 22(5): 1255-1276.
2. Union, European Commission. (2011). "**COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial.**" [online] 18 Oct. 2011 [cited 18 Aug. 2017]. Available from <URL: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>.
3. Riehemann, K., S. W. Schneider, et al. (2009). "**Nanomedicine--challenge and perspectives.**" Angew Chem Int Ed Engl 48(5): 872-897.
4. Prajapati, B. (2008). "**Nanoparticles As Platforms For Targeted Drug Delivery System In Cancer Therapy.**" The Internet Journal of Nanotechnology 3(1).
5. Bahadar, H., F. Maqbool, et al. (2016). "**Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models.**" Iran Biomed J 20(1): 1-11.
6. Donaldson, K., V. Stone, et al. (2004). "**Nanotoxicology.**" Occup Environ Med 61(9): 727-728.
7. Joris, F., B. B. Manshian, et al. (2013). "**Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap.**" Chem Soc Rev 42(21): 8339-8359.
8. Khanna, P., C. Ong, et al. (2015). "**Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death.**" Nanomaterials (Basel) 5(3): 1163-1180.
9. Shah, P., A. Kaushik, et al. (2014). "**Chip based single cell analysis for nanotoxicity assessment.**" Analyst 139(9): 2088-2098.
10. Andreani, T., Severino, P., Hollanda, L., Vazzana, M., Souto, S., Santini, A., et al. (2017). **Chapter 9 – Cancer therapies: applications, nanomedicines and nanotoxicology.** In Alexandru Grumezescu Anton Fica Nanostructures for Cancer Therapy 1st Edition.
11. Balasubramanian, S. K., J. Jittiwat, et al. (2010). "**Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats.**" Biomaterials 31(8): 2034-2042.
12. Braakhuis, H. M., I. Gosens, et al. (2014). "**Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles.**" Part Fibre Toxicol 11: 49.
13. Braakhuis, H. M., S. K. Kloet, et al. (2015). "**Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles.**" Arch Toxicol 89(9): 1469-1495.

14. Shrivastava, R., S. Raza, et al. (2014). **"Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain."** Drug Chem Toxicol 37(3): 336-347.
15. Sahay, G., D. Y. Alakhova, et al. (2010). **"Endocytosis of nanomedicines."** J Control Release 145(3): 182-195.
16. Frohlich, E. (2012). **"The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles."** Int J Nanomedicine 7: 5577-5591.
17. Fletcher, D. A. and R. D. Mullins (2010). **"Cell mechanics and the cytoskeleton."** Nature 463(7280): 485-492.
18. Li, J., H. Mao, et al. (2017). **"Insight into the interactions between nanoparticles and cells."** Biomater Sci 5(2): 173-189.
19. Manke, A., L. Wang, et al. (2013). **"Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity."** Biomed Res Int 2013: 942916.
20. Doktorovova, S., D. L. Santos, et al. (2014). **"Cationic solid lipid nanoparticles interfere with the activity of antioxidant enzymes in hepatocellular carcinoma cells."** Int J Pharm 471(1-2): 18-27.
21. Fu, P. P., Q. Xia, et al. (2014). **"Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species."** J Food Drug Anal 22(1): 64-75.
22. Wang, Y., W. G. Aker, et al. (2011). **"A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells."** Sci Total Environ 409(22): 4753-4762.
23. Wang B, Feng W , Zhu M, et al. (2009). **"Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice."** J Nanopart Res;11(1) :41-53
24. He, X., S. H. Young, et al. (2011). **"Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-kappaB signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation."** Chem Res Toxicol 24(12): 2237-2248
25. Ayala, A., M. F. Munoz, et al. (2014). **"Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal."** Oxid Med Cell Longev 2014: 360438.
26. Hanaa Ali Hassan Mostafa Abd El-Aal (2012). **"Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer**

of Free Radicals, Lipid Peroxidation". Dr. Angel Catala (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/45944. Available from: <https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-end-products-as-a-key-of-oxidative-stress-effect-of-antioxidant-on-their-producti>

27. Akhtar, M. J., M. Ahamed, et al. (2010). "**Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells.**" Toxicology 276(2): 95-102.

28. Ma, D. D. and W. X. Yang (2016). "**Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy.**" Oncotarget 7(26): 40882-40903.

29. Asweto, C. O., J. Wu, et al. (2017). "**Cellular pathways involved in silica nanoparticles induced apoptosis: A systematic review of in vitro studies.**" Environ Toxicol Pharmacol 56: 191-197.

30. Zhang, X. Q., L. H. Yin, et al. (2011). "**ZnO, TiO₂, SiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts.**" Biomed Environ Sci 24(6): 661-669.

31. Park, E. J., J. Choi, et al. (2008). "**Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells.**" Toxicology 245(1-2): 90-100.

32. Park, E. J. and K. Park (2009). "**Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro.**" Toxicol Lett 184(1): 18-25.

33. Smolkova, B., M. Dusinska, et al. (2017). "**Nanomedicine and epigenome. Possible health risks.**" Food Chem Toxicol.

34. Singh, N., B. C. Nelson, et al. (2017). "**Exposure to Engineered Nanomaterials: Impact on DNA Repair Pathways.**" Int J Mol Sci 18(7).

35. Pilger, A. and H. W. Rudiger (2006). "**8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures.**" Int Arch Occup Environ Health 80(1): 1-15.

36. Doktorovova, S., E. B. Souto, et al. (2014). "**Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data.**" Eur J Pharm Biopharm 87(1): 1-18

37. Karlsson, H. L., A. R. Gliga, et al. (2014). "**Mechanism-based genotoxicity screening of metal oxide nanoparticles using the ToxTracker panel of reporter cell lines.**" Part Fibre Toxicol 11: 41.

38. D'Urso, A. and J. H. Brickner (2014). "**Mechanisms of epigenetic memory.**" Trends Genet 30(6): 230-236

39. Wong, B. S. E., Q. Hu, et al. (2017). "Epigenetic modulations in nanoparticle-mediated toxicity." Food Chem Toxicol.
40. Boyoglu, C., Q. He, et al. (2013). "Microscopic Studies of Various Sizes of Gold Nanoparticles and Their Cellular Localizations." ISRN Nanotechnology 2013: 13.
41. Oh, W. K., S. Kim, et al. (2010). "Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality." ACS Nano 4(9): 5301-5313.
42. Wang, S., W. Lu, et al. (2008). "Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes." Chem Phys Lett 463(1-3): 145-149.
43. McLaren, A., T. Valdes-Solis, et al. (2009). "Shape and size effects of ZnO nanocrystals on photocatalytic activity." J Am Chem Soc 131(35): 12540-12541.
44. Shi, M., H. S. Kwon, et al. (2012). "Effects of surface chemistry on the generation of reactive oxygen species by copper nanoparticles." ACS Nano 6(3): 2157-2164.
45. Pfeiffer, C., C. Rehbock, et al. (2014). "Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles." J R Soc Interface 11(96): 20130931.
46. Corbo, C., R. Molinaro, et al. (2016). "The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery." Nanomedicine (Lond) 11(1): 81-100.
47. De Paoli, S. H., L. L. Diduch, et al. (2014). "The effect of protein corona composition on the interaction of carbon nanotubes with human blood platelets." Biomaterials 35(24): 6182-6194.
48. Wang, F., L. Yu, et al. (2013). "The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes." Nanomedicine 9(8): 1159-1168.
49. Ivask, A., A. J. Mitchell, et al. (2017). "Methodologies and approaches for the analysis of cell-nanoparticle interactions." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.
50. Peuschel, H., T. Ruckelshausen, et al. (2015). "Quantification of Internalized Silica Nanoparticles via STED Microscopy." Biomed Res Int 2015: 961208.
51. Dorney, J., F. Bonnier, et al. (2012). "Identifying and localizing intracellular nanoparticles using Raman spectroscopy." Analyst 137(5): 1111-1119.
52. Zimbone, M., P. Baeri, et al. (2014). "Dynamic light scattering on bioconjugated laser generated gold nanoparticles." PLoS One 9(3): e89048.

53. Clogston, J. D. and A. K. Patri (2011). "**Zeta potential measurement.**" Methods Mol Biol **697**: 63-70.
54. Li, Y., H. Zhao, et al. (2017). "**TiO₂ nanoparticles supported on PMMA nanofibers for photocatalytic degradation of methyl orange.**" J Colloid Interface Sci **508**: 500-507.
55. Cho, E. C., Q. Zhang, et al. (2011). "**The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles.**" Nat Nanotechnol **6(6)**: 385-391.
56. Lorscheidt, S. and A. Lamprecht (2016). "**Safety assessment of nanoparticles for drug delivery by means of classic in vitro assays and beyond.**" Expert Opin Drug Deliv **13(11)**: 1545-1558.
57. Maurer-Jones, M. A., K. C. Bantz, et al. (2009). "**Toxicity of therapeutic nanoparticles.**" Nanomedicine (Lond) **4(2)**: 219-241.
58. Vicente, S., C. Moia, et al. (2017). "**In vitro evaluation of the internalization and toxicological profile of silica nanoparticles and submicroparticles for the design of dermal drug delivery strategies.**" J Appl Toxicol
59. Hanley, C., A. Thurber, et al. (2009). "**The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction.**" Nanoscale Res Lett **4(12)**: 1409-1420.
60. Alfaro-Moreno, E., T. S. Nawrot, et al. (2008). "**Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM₁₀.**" Eur Respir J **32(5)**: 1184-1194.
61. Shah, P., X. Zhu, et al. (2016). "**Microelectromechanical System-Based Sensing Arrays for Comparative in Vitro Nanotoxicity Assessment at Single Cell and Small Cell-Population Using Electrochemical Impedance Spectroscopy.**" ACS Appl Mater Interfaces **8(9)**: 5804-5812.
62. Zhang, Y. S. and A. Khademhosseini (2015). "**Seeking the right context for evaluating nanomedicine: from tissue models in petri dishes to microfluidic organs-on-a-chip.**" Nanomedicine (Lond) **10(5)**: 685-688.
63. Wills, J. W., N. Hondow, et al. (2016). "**Genetic toxicity assessment of engineered nanoparticles using a 3D in vitro skin model (EpiDerm).**" Part Fibre Toxicol **13(1)**: 50.
64. Muoth, C., A. Wichser, et al. (2016). "**A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment.**" Nanoscale **8(39)**: 17322-17332.
65. Repetto, G., A. del Peso, et al. (2008). "**Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity.**" Nat Protoc **3(7)**: 1125-1131.4
66. Gatehouse, D. (2012). "**Bacterial mutagenicity assays: test methods.**" Methods Mol Biol **817**: 21-34.

67. Li, Y., D. H. Chen, et al. (2012). "**Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay.**" *Mutat Res* 745(1-2): 4-10.
68. Armand, L., M. Biola-Clier, et al. (2016). "**Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view.**" *J Proteomics* 134: 163-173.
69. Pham, D. H., B. De Roo, et al. (2016). "**Use of Zebrafish Larvae as a Multi-Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles.**" *Sci Rep* 6: 37145.
70. Fent, K., C. J. Weisbrod, et al. (2010). "**Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages.**" *Aquat Toxicol* 100(2): 218-228.
71. Ahn, J. M., H. J. Eom, et al. (2014). "**Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*.**" *Chemosphere* 108: 343-352.
72. Yang, Y. F., Y. J. Lin, et al. (2017). "**Toxicity-based toxicokinetic/toxicodynamic assessment of bioaccumulation and nanotoxicity of zerovalent iron nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*.**" *Int J Nanomedicine* 12: 4607-4621.
73. Rathod, L. V., R. Kapadia, et al. (2017). "**A novel nanoparticles impregnated ocular insert for enhanced bioavailability to posterior segment of eye: In vitro, in vivo and stability studies.**" *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 71: 529-540.
74. "**bioinformatics.**" [online] *Bioinformatic* 2013 Jun 26 [cited 01 Sep 2017]. Available from URL: <https://www.britannica.com/science/bioinformatics> .
75. Hinderliter, P. M., K. R. Minard, et al. (2010). "**ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies.**" *Part Fibre Toxicol* 7(1): 36.
76. Gajewicz, A. (2017). "**What if the number of nanotoxicity data is too small for developing predictive Nano-QSAR models? An alternative read-across based approach for filling data gaps.**" *Nanoscale* 9(24): 8435-8448.
77. Puzyn, T., B. Rasulev, et al. (2011). "**Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles.**" *Nat Nanotechnol* 6(3): 175-178.

Annex I – Methods for cell-Nanoparticle Analysis

TABLE 1 | Attributes and Limitations of Selected Currently Available Methods for Cell-Nanoparticle Analysis

	Nano-Scale Resolution	Nanoparticle Identification	Nanoparticle Quantitation	Nanoparticle Transformation	Cellular Localization of Nanoparticles	High Throughput	Single Cell Analysis	Live Cell Analysis	Sample Preservation
Fluorescence microscopy	-/+ ¹	+	-	-/+ ²	+	-/+	+	+	+
Dark-field microscopy	+	+/- ³	-	+/- ³	+	-	+	+	+
Raman microspectroscopy	-/+ ⁴	-	-	-	+	-	+	+	+
Electron microscopy	+	+	-	-/+ ⁵	+	-	+	-/+ ⁶	+/-
Flow cytometry	-	+	-/+ ⁷	-/+ ²	+	+	+	+	+
Mass spectrometry (e.g., ICP-MS) ⁹	-	-	+	-	-/+ ⁸	+	-	-	-
Laser ablation ICP-MS ⁹	+	-	+	-	-/+ ⁸	+	+	+	-
Time-resolved ICP-MS ⁹	+	+	+	-	-/+ ⁸	+	+	+	-
nano-Secondary ionization mass spectrometry	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Mass cytometry ⁹	+	+	+	-	-/+ ⁸	+	+	+	-
Synchrotron X-ray absorption spectroscopy	+	+	-	+	-/+ ⁸	-	+	+	+

ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry.

+, Information can be obtained with the respective methodology; -, information cannot be obtained with the respective methodology; -/+ or +/-, information can be obtained with certain reservations.

¹ Nanoscale resolution possible when using superresolution mode.

² Nanoparticle transformation is possible to track if the transformation affects NP fluorescence.

³ Nanoparticle identification possible by parallel application of hyperspectral imaging.

⁴ Nanoscale resolution possible by surface enhanced Raman spectroscopy.

⁵ Nanoparticle transformation is possible to track if the transformation affected NP morphology.

Table from: Ivask, A., A. J. Mitchell, et al. (2017). "Methodologies and approaches for the analysis of cell-nanoparticle interactions." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.

Annex 2 – Examples of In vitro/In vivo studies on toxicity of NPs

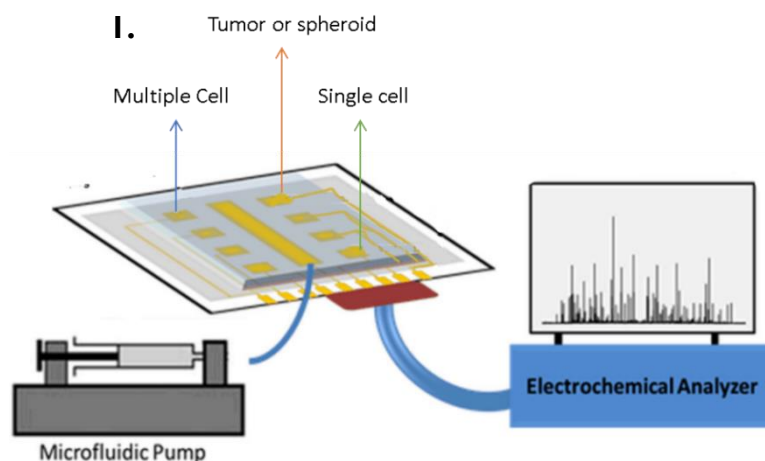
Table 1. *In vitro/in vivo* studies on toxicity of various types of NPs

NPs and size (nm)	Concentration and exposure duration	Species/cell culture	Assay technique	Result	Ref.
Aluminum oxide (8-12)	1-10 μ M 24 h	HBMVECs	MTT DHE	Cell viability \downarrow Mitochondrial function \downarrow Oxidative stress \uparrow Alter proteins expression of the BBB	[16]
Aluminum oxide (50-80)	10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL 24 h	Mammalian cells	EZ4U	No significant toxic effect on cell viability	[17]
Aluminum oxide (160)	25-40 μ g/mL 12 h	HMSC	MTT	Cell viability \downarrow	[18]
Aluminum oxide (30-40)	500-2000 mg/kg 72 h	Rat blood cells	Comet Micronucleus	Dose-dependent genotoxicity	[19]
Aluminum oxide (50)	0-5000 μ g/mL 2 h	MLCL	Comet	DNA damage	[20]
Copper oxide (50)	10, 25, 50 μ g/mL 24 h	Human lung epithelial cells	MTT LDH	Cell viability \downarrow LDH \uparrow Lipid peroxidation \uparrow	[30]
MWCNTs (20)	0.002-0.2 μ g/mL 4 days	Lung cancer cells	MTT	Cell viability \downarrow	[58]
SWCNT (800)	0-400 μ g/mL 10 days	HACECs NHBECS	Clonogenic	Cell death	[59]
SWCNTs (10-30)	40 and 200 μ g/mouse, 1 mg/mouse, 90 days	<i>in vivo</i>	Commercial kits	LDH \uparrow AST \uparrow ALT \uparrow	[61]
Fullerenes (178)	1 ng/mL 80 days	CHO HELA HEK293	Micronucleus test	DNA strand breakage Chromosomal damage	[67,68]
Silica (15-46)	10-100 μ g/mL 48 h	Human bronchoalveolar carcinoma cells	DCFH-DA Commercial kit	ROS \uparrow LDH \uparrow Malondialdehyde \uparrow	[73]
Silica (43)	25-200 μ g/mL 3-24 h	Hepatocellular carcinoma cells (HepG2)	DCFH-DA 5,5,6,6-tetraethylbenzimidazo-lylcarbo-cyanide iodine	ROS \uparrow Mitochondrial damage Oxidative stress \uparrow	[76]
Silver (15-100)	10-50 μ g/mL 24 h	BRL 3A	LDH MTT Glutathione DCFH-DA	Cell viability \downarrow LDH \uparrow ROS \uparrow	[33]
Silver (30-50)	0-20 μ g/mL 24 h	Human alveolar cell line	MTT DCFH-DA	Cell viability \downarrow ROS \uparrow	[34]
Silver (20-40)	---	Human leukemia cell line	WST-1 LDH	Cell viability \downarrow LDH \uparrow	[35]
Zinc oxide (50-70)	11.5 μ g/mL 24 h	Human colon carcinoma cells	ELISA Flow-cytometry	Oxidative stress \uparrow Cell viability \downarrow Inflammatory biomarkers	[1]

HBMVECs, Human brain micro vascular endothelial cells; DHE, Dihydroethidium; BBB, blood- brain- barrier; HMSC, Human mesenchymal stem cells; MLCL, Mouse lymphoma cells line; LDH, Lactate dehydrogenase; MWCNTs, Multi- walled carbon nano tubes; SWCNTs: Single walled carbon nano tubes; HACECs, Human alveolar carcinoma epithelial cell line; NHBECS, Normal human bronchial epithelial cell line; AST: Aspartate transaminase; ALT, Alanine transaminase; CHO, Chinese Hamster ovary cells; HELA, Human epidemoid-like-carcinoma cells; HEK: Human embryonic kidney cells; DCFH-DA, Dichlorodihydrofluorescein diacetate; ROS, Reactive oxygen species; BRL 3A, Buffalo rat liver cells. \uparrow = increase and \downarrow = decrease.

Table from: Bahadar, H., F. Maqbool, et al. (2016). "Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models." *Iran Biomed J* 20(1): 1-11.

Annex 3 – Cell-On-a-Chip representations



2.

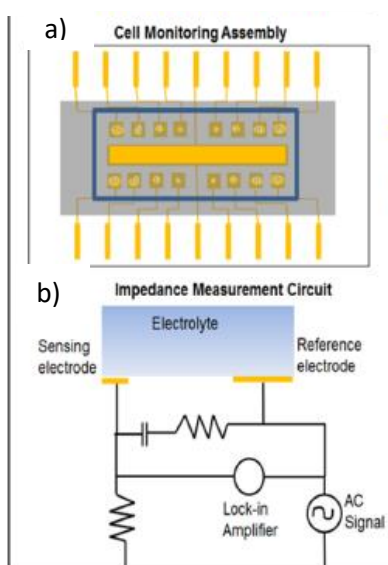


Fig.1- Schematic of an ideal microfluidic CoC device for nanotoxicity assessment. This CoC allows an assessment of a single cell toxicity because of its possible blocking of the neighbor influence and the cellular communication.

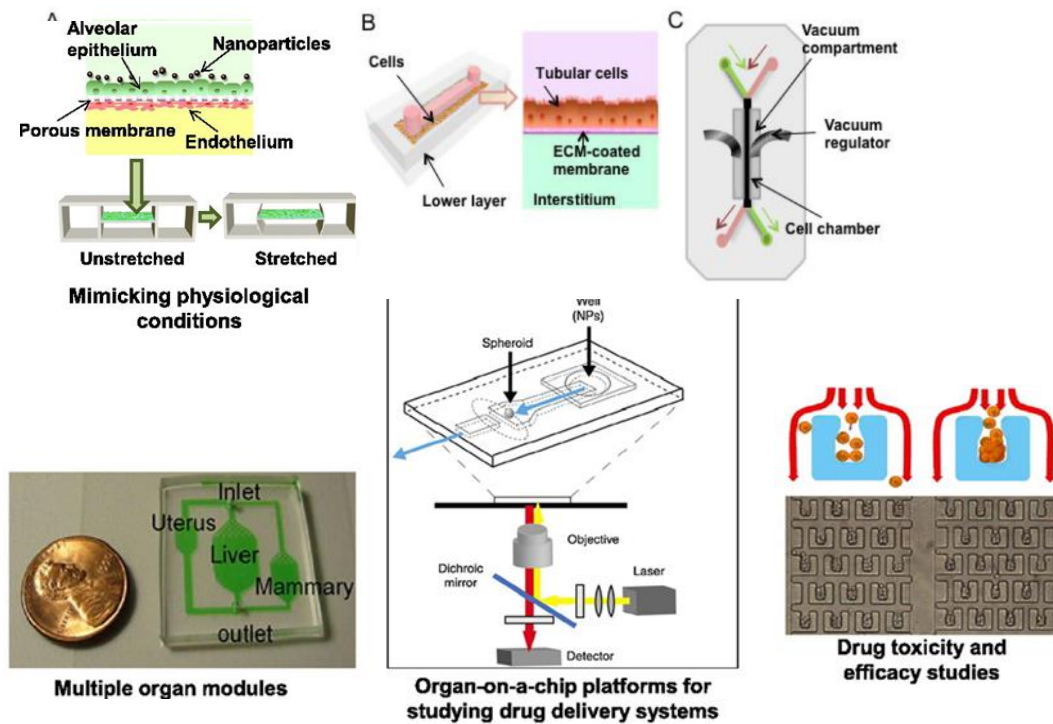
Adapted from: (Shah, 2014)

Fig.2- Representation of CoC assembly. a) Cell monitoring device assembly with growth solution and monitoring cell impedance; and b) electronic cell impedance sensing a single electrode.

Adapted from: (Shah, 2016)

1. Shah, P., A. Kaushik, et al. (2014). "Chip based single cell analysis for nanotoxicity assessment." *Analyst* 139(9): 2088-2098.
2. Shah, P., X. Zhu, et al. (2016). "Microelectromechanical System-Based Sensing Arrays for Comparative in Vitro Nanotoxicity Assessment at Single Cell and Small Cell-Population Using Electrochemical Impedance Spectroscopy." *ACS Appl Mater Interfaces* 8(9): 5804-5812.

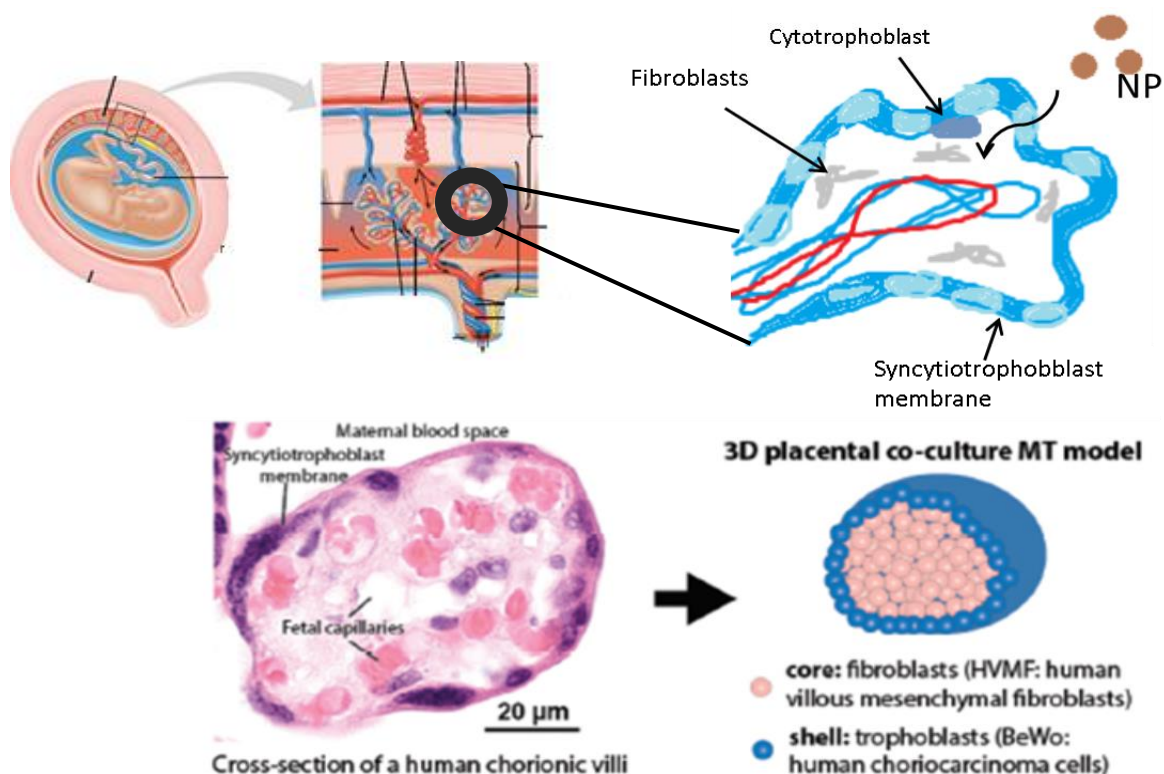
Annex 4 – Organ-On-a-Chip representations



OoC representation and images of some multiple organ modules. The creation of OoC platforms assumes an integrating of microfluidic networks with 3D tissue engineered. This model is able to meet the demand of creating robust preclinical screening models.

Adapted from: N. S., J. Ribas, et al. (2014). "Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems." J Control Release 190: 82-93.

Annex 5 – Representation of a 3D-Culture microtissue model



Representation of the 3D model of the human placenta to do a nanotoxicity assessment. This model is a co-culture model is composed of an arc of BeWO trophoblasts (blue) with an inner core of HVMF fibroblasts (rose), which is a real in vitro representation of the placenta's specific barrier function.

Adapted from: Muoth, C., A. Wichser, et al. (2016). "A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment." *Nanoscale* 8(39): 17322-17332.