



Análise da predição de toxicidade de dendrímeros PAMAM de baixa geração

Analysis of low-generation PAMAM dendrimer toxicity prediction

Cairo Alencar Zancanella*, Danielle Vitoria Santana Dias[†],
Handriela de Oliveira Hoff[‡], Renato Eising[§].

RESUMO

Os dendrímeros vêm emergindo como promessas de módulos de *delivery* de fármacos por conta das suas estruturas específicas e da presença de cavidades internas controláveis, fazendo com que essas macromoléculas se tornem ideais para a encapsulação de drogas específicas. O presente trabalho teve como objetivo realizar predições de toxicidade para 6 estruturas de dendrímeros PAMAM de geração -0.5, 0, 0.5, 1, 2 e 3. Além de comparar os resultados obtidos com outros estudos disponíveis em literatura. Para tal, foram realizados testes de toxicidade, *in silico*, nos sites ProTox-II e pkCSM para estas estruturas. Nenhuma estrutura deste estudo apresentou efeito tóxico nos parâmetros medidos pelos softwares. Contudo, infelizmente, os dendrímeros PAMAM sem modificações dificilmente são utilizados *in vivo* por causa da toxicidade associada à carga e rápida eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES). Ademais, se faz necessário realizar mais pesquisas neste campo, visto suas dificuldades e seu enorme potencial na área biomédica.

Palavras-chave: Dendrímeros, Química, Imunologia.

ABSTRACT

Dendrimers have emerged as promises of drug delivery modules because of their specific structures and the presence of controllable internal cavities, causing these nanomolecules to become ideas for the encapsulation of specific drugs. The present study aimed to make predictions of toxicity for 6 PAMAM dendrimer structures of generation -0.5, 0, 0.5, 1, 2 and 3. In addition to comparing the results obtained with other studies available in the literature. For this, toxicity tests were performed, *in silico*, in Protox-II and pkCSM sites for these structures. No structure of this study had a toxic effect on the parameters measured by the software. However, unfortunately, unmodified PAMAM dendrimers are hardly used *in vivo* because of loading toxicity and rapid elimination by the reticuloendothelial system (RES). In addition, it is necessary to carry out more research in this field, given its difficulties and its enormous potential in the biomedical area.

Keywords: Dendrimers, Chemistry, Immunolog

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; cairo.zancanella@gmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo, Paraná, Brasil; daniellevsd@gmail.com

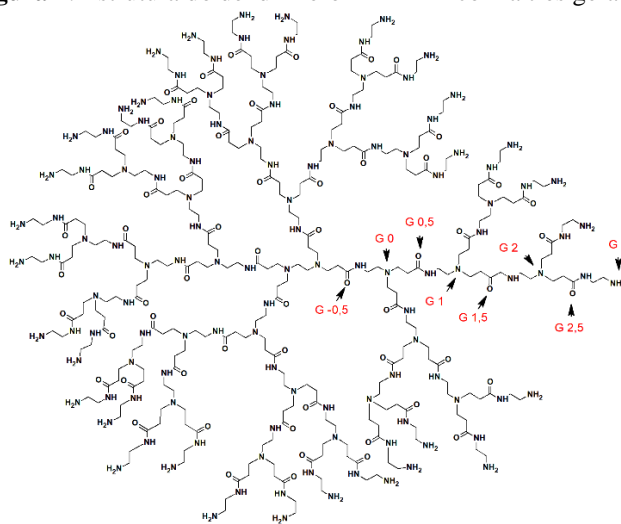
[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo, Paraná, Brasil; hadrieladeoliveira@hotmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo, Paraná, Brasil renatoeising@utfpr.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Um dendrímero consiste em uma molécula de núcleo central rodeada por ramos, denominados *dedrons*, terminados em grupos de superfície funcionais (Figura 1). Essas moléculas vêm emergindo como promessas de módulos de delivery de fármacos por conta das suas estruturas específicas e da presença de cavidades internas controláveis, fazendo com que elas se tornem ideais para a encapsulação de drogas. Contudo existe uma toxicidade associada a essas estruturas devido aos grupos terminais NH_2 e das múltiplas cargas catiônicas, o que faz com que suas aplicações clínicas sejam limitadas (Jain et al., 2010; Janaszewska et al., 2019).

Figura 1. Estrutura do dendrímero PAMAM com a três gerações.



Fonte: Autoria própria.

A citotoxicidade desses materiais vai depender fortemente da natureza e do número dos grupos funcionais de superfície. Comumente dendrímeros catiônicos exibem alta toxicidade, enquanto dendrímeros aniônicos ou neutros apresentam baixo efeito tóxico. Outrossim, é possível realizar uma modificação da superfície do dendrímero catiônico com frações neutras ou carregadas negativamente, diminuindo sua citotoxicidade (Janaszewska *et al.*, 2019).

Devido a situação pandêmica ainda vivida no Brasil, não foi possível realizar nenhuma prática laboratorial para aprimorar mais este projeto. Contudo, futuramente as informações aqui obtidas serão de grande ajuda para futuras pesquisas. Em decorrer disto, o presente trabalho teve como objetivo realizar predições de toxicidade para 6 estruturas de dendrímeros PAMAM de geração -0.5; 0; 0.5; 1; 2 e 3. Além de comparar os resultados obtidos com outros estudos disponíveis em literatura.

2 MÉTODO

Foram realizados testes de toxicidade, *in silico*, para 6 estruturas de dendrímeros PAMAM, G-0.5, G0, G0.5, G1, G2, G3. Em seguida, os resultados obtidos foram comparados com outros dados disponíveis em literatura. Ressalta-se que para dendrímeros de baixa geração as informações a respeito de efeitos tóxicos são um pouco escassas. Para todos os dendrímeros foram preditos os efeitos de hepatotoxicidade,



carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, vias de sinalização do receptor nuclear Tox21 e vias de resposta ao estresse Tox21

As simulações virtuais foram efetuadas nas plataformas “ProTox-II - Prediction Of Toxicity Of Chemicals” (disponível em: https://tox-new.charite.de/prottox_II/index.php?site=home) e a “Pharmacokinetic properties - pkCSM” (disponível em: <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>). As predições de toxicidade no site ProTox não suportam dendrímeros de geração 2 ou mais (também não suportou o PAMAM G1.5). Para estes foram utilizados o pkCSM que apresenta resultados mais simples e diretos.

3 RESULTADOS

Os resultados das predições de todas as gerações encontram-se nos Quadros 1 e 2. As predições obtidas para o PAMAM G-0.5 não apresentam quase nenhum efeito tóxico, corroborando outros resultados disponíveis em literatura. De acordo com Najlah *et al.* (2007), os dendrímeros de PAMAM G0 nativos não eram tóxicos para células Caco-2 em concentrações de até 10 mM dentro de 3 horas de incubação. Considera-se que a G0 não é utilizada diretamente para o delivery de fármacos e sim como o primeiro passo para a síntese de um dendrímero de geração mais elevada. Portanto, essa toxicidade carcinogênica não afetaria o dendrímero final.

Diferentemente da molécula anterior, o PAMAM G0 não apresentou nenhum efeito tóxico. Podendo-se afirmar que os resultados obtidos corroboram com os disponíveis em literatura, pois de acordo com Roberts *et al.* (1996), dendrímeros de baixa geração (abaixo de G5.0) não se mostraram tóxicos para mamíferos adultos.

Quadro 1. Relatório de resultados de toxicidade para os dendrímeros PAMAM G -0.5, 0 e 0.5 obtidos na plataforma ProTox-II.

Tópicos	PAMAM G -0.5	PAMAM G0	PAMAM G0.5
Hepatotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Carcinogenicidade	Ativo	Inativo	Inativo
Imunotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Mutagenicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Citotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Inativo	Inativo	Inativo
Vias de resposta ao estresse Tox21	Inativo	Inativo	Inativo

Fonte: Autoria própria.

Quadro 2. Relatório de resultados de toxicidade para os dendrímeros PAMAM G 1, 2 e 3 obtidos na plataforma pkCSM.

Tópicos	PAMAM G 1	PAMAM G2	PAMAM G3
Hepatotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Carcinogenicidade	Ativo	Inativo	Inativo
Imunotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo



Mutagenicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Citotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Inativo	Inativo	Inativo
Vias de resposta ao estresse Tox21	Inativo	Inativo	Inativo

Fonte: Autoria própria.

A terceira estrutura, PAMAM G0.5, não apresentou toxicidade em órgãos, pontos finais de toxicidade e nas vias de Tox21. Observa-se que o ponto final de toxicidade com a maior probabilidade de apresentar algum efeito tóxico é a carcinogenicidade.

Como descrito por Malik *et al.* (2000), a hemólise induzida por PAMAM, foi claramente dependente da geração ao longo do intervalo de gerações 1 a 4. Ressalta-se que em condições fisiológicas (pH = 7,4) as aminas primárias dos dendrímeros PAMAM são carregadas positivamente, apresentando certa toxicidade. Justamente por estar em contato com a membrana celular que é carregada negativamente. Porém essa toxicidade é associada com o aumento na geração dos dendrímeros, pois o número de grupos amina terminais se eleva (Sorroza-Martínez *et al.*, 2020).

Não foi observado nenhum efeito tóxico para estrutura PAMAM G1. Como já foi descrito por Malik *et al.* (2000), e Duncan e Izzo (2005), os dendrímeros de baixa geração não apresentam toxicidade celular. Além disso, os resultados obtidos no estudo de Sorroza-Martínez *et al.* (2020), mostraram que os dendrímeros PAMAM de primeira geração não apresentaram nenhum tipo de toxicidade para as linhagens celulares testadas na pesquisa.

O PAMAM G2 compreende 16 grupos de NH₂ superficiais e peso molecular de 3270,271. Os resultados dessa predição não mostraram nenhum efeito tóxico em órgãos ou pontos finais de toxicidade. Pode-se relacionar os resultados obtidos com o estudo de Shcharbin *et al.* (2009), no qual as gerações de dendrímeros G1, G2 e G3 são atóxicas. Além disso, estes dendrímeros de baixa geração apresentam potencial para a transfecção gênica, sendo mais estáveis no soro, eficientes na captação celular, condensação e liberação do DNA e fáceis de modificar em comparação com os dendrímeros de geração superior (Alajangi *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2018), demonstra que os dendrímeros PAMAM de alta geração (G4 ou maior) apresentam eficácia de transfecção genética relativamente elevada com citotoxicidade demonstrada *in vivo* e *in vitro*. Em contraste, os dendrímeros de baixa geração (G0 a G3) diminuem sua eficácia de transfecção e quase não são citotóxicos.

A sexta e última estrutura estudada é um dendrímero PAMAM de terceira geração (G3), que compreende 32 grupos de NH₂ superficiais e peso molecular de 6923,007. Os resultados da predição mostram que esta macromolécula também não apresenta nenhum efeito tóxico para os seres humanos. Como os dendrímeros de terceira geração apresentam um tamanho pequeno, é possível que estes atinjam o interior do núcleo. Embora não haja evidências de que este tipo de nanopartículas interfira com a função endócrina (Lu *et al.*, 2013), suas características abrem a possibilidade de que os dendrímeros PAMAM G3 possam alterar a atividade regular dos receptores nucleares hormonais (NRs) ou interagir com seus hormônios associados (Planelló *et al.*, 2021).

Yang e Kao (2006) demonstraram que os dendrímeros PAMAM G3.5 não reduzem a viabilidade dos fibroblastos *in vitro*, enquanto os dendrímeros G4 PAMAM causam citotoxicidade dependente da



concentração e do tempo em fibroblastos. Já na pesquisa de Planelló *et al.* (2021), foi confirmada a habilidade de dendrímeros G3-NH₂ para perturbar a função endócrina.

4 CONCLUSÃO

Devido a capacidade dos dendrímeros PAMAM de alterar a transcrição de genes que codificam para diferentes enzimas de biotransformação e desintoxicação, podendo comprometer seriamente o funcionamento adequado dessas vias metabólicas e, portanto, a capacidade adaptativa dos organismos expostos e considerando os resultados, destacam-se as disparidades nos efeitos tóxicos dos dendrímeros na integridade do DNA e ressalta-se a necessidade de pesquisas adicionais sobre o modo de ação dessas moléculas (Planelló *et al.*, 2021).

Infelizmente, os dendrímeros PAMAM sem modificações são dificilmente utilizados *in vivo* por causa da toxicidade associada à carga e rápida eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES) (Luong *et al.*, 2016 e Hu *et al.*, 2014). Os dendrímeros catiônicos PAMAM são susceptíveis a reagir com membranas biológicas carregadas negativamente e a desorganizar a estrutura da bicamada lipídica, resultando em morte celular (Do *et al.*, 2020).

Apesar dos testes de predição virtuais serem ferramentas muito interessantes e terem apresentado resultados de não toxicidade para os dendrímeros estudados, exceto a carcinogenicidade para o PAMAM G-0.5 esses softwares apresentam limitações. Como os dendrímeros PAMAM são moléculas de alto peso molecular, as leituras realizadas pelo software são lentas e não renderizam toda a estrutura (como ocorreu no site ProTox-II).

Ademais, ressalta-se a importância da realização de testes *in vitro* e *in vivo*, possibilitando a confirmação ou não, dos efeitos tóxicos dos dendrímeros. Assim como a execução de mais pesquisas sobre dendrímeros PAMAM e seus efeitos no organismo humano.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de registrar os agradecimentos a UTFPR-Toledo, ao CNPQ e a CAPES por disponibilizar os equipamentos e laboratórios, incentivar e auxiliar nas questões financeiras para continuidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALAJANGI, H. K.; NATARAJAN, P.; Vij, M.; GANGULI, M.; Santhiya, D. **Role of Unmodified Low Generation – PAMAM Dendrimers in Efficient Non-Toxic Gene Transfection**. ChemistrySelect, 2016.

DO, Vo M. H.; BACH, L. G.; TRAN, D. H. N.; CAO, V. D.; NGUYEN, T. N. Q.; HOANG, D. T.; NGO, V. C.; NGUYEN, D. H.; THI, T. T. H. **Effective Elimination of Charge-associated Toxicity of Low Generation Polyamidoamine Dendrimer Eases Drug Delivery of Oxaliplatin**. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020.

DUNCAN, R.; IZZO, L. **Dendrimer biocompatibility and toxicity**. Drug Delivery Rev., 2005.

HU, W. L.; CHENG, L.; CHENG, M.; ZHENG, Q.; LEI, Z.; HU, M.; XU, L.; CHEN, D. **Redox and pH-responsive poly(amidoamine) dendrimer–poly (ethylene glycol) conjugates with disulfide linkages for efficient intracellular drug release**. Biointerfaces, 2014.



JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA U.; JAIN N. K. **Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge.** International Journal of Pharmaceutics, 2010.

JANASZEWSKA, A.; LAZNIEWSKA, J.; TRZEPINSK, P.; MARCINKOWSKA, M.; KLAINERT, M. B. **Cytotoxicity of dendrimers.** Biomolecules, 2019.

LI, J.; LIANG, H.; LIU, J.; WANG, Z. **Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy.** Int. J. Pharm, 2018.

LU, X.; LIU, Y.; KONG, X.; LOBIE, P.E.; CHEN, C.; ZHU, T. **Nanotoxicity: a growing need for study in the endocrine system.** Small 9, 2013.

LUONG, D., P.; KESHARWAI, R.; DESHMUKH, M. C. I.; MOHD A. U.; GUPTA, K.; GREISH, A. K. **PEGylated PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery.** Acta Biomater, 2016.

MALIK, N.; WIWATTANAPATAPEE, R.; KLOPSCH, R.; LORENZ, K.; FREY, H.; WEENER, J.; MEIJER, E.; PAULUS, W.; DUNCAN, R. **Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo.** J Controlled Release, 2000.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. **In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery.** Int. J. Pharm, 2007.

PLANELLÓ, R.; ROSAL, R.; AQUILINO, M.; HERRERO, O. **Genotoxic effects and transcriptional deregulation of genetic biomarkers in Chironomus riparius larvae exposed to hydroxyl- and amine-terminated generation 3 (G3) polyamidoamine (PAMAM) dendrimers.** Science of The Total Environment, 2021.

SORROZA-MARTÍNEZ, K.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, I.; MARTÍNEZ-SERRANO, R. D.; SOLANO, J. D.; RUIU, A.; ILLESCAS, J.; ZHU, X. X.; RIVERA, E. **Efficient modification of PAMAM G1 dendrimer surface with β -cyclodextrin units by CuAAC: Impact on the water solubility and cytotoxicity.** RSC Advances, 2020.

SHAH, N.; STEPTOE, R. J.; PAREKH, H. S. **Low-generation asymmetric dendrimers exhibit minimal toxicity and effectively complex DNA.** J. Pept. Sci, 2011.

SHCHARBIN, D. G.; KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. **Dendrimers in gene transfection.** Biochem, 2009.

YANG, H.; KAO, W. J. **Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications.** J Biomater Sci Polym Ed, 2006.

YANG, H.; LOPINA, S. T.; DIPERSIO, L. P.; SCHMIDT, S. P. **Stealth dendrimers for drug delivery: correlation between PEGylation, cytocompatibility, and drug payload.** J. Mater. Sci.Mater. Med. 19, 2019.