




Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação 
Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica

**ADMINISTRAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO
“MULTIWALLED” *IN VIVO* ATIVA CITOTOXICIDADE
TUMOR-ESPECÍFICA DE LINFÓCITOS T CD8⁺**

Autor: Adriel dos Santos Moraes

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Elétrica. Área de Concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica.**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vitor Baranauskas — FEEC/UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti — IB/UNICAMP

Dr. Helder José Ceragioli — FEEC/UNICAMP

Campinas – SP

27/02/2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M971a Moraes, Adriel dos Santos
Administração de nanotubos de carbono
"multiwalled" in vivo ativa citotoxicidade tumor -
específica de linfócitos T CD8+ / Adriel dos Santos
Moraes. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Vitor Baranauskas.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Nanotubos de Carbono. 2. Carcinoma. 3. Resposta
imune. I. Baranauskas, Vitor. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação. III. Título.

Título em Inglês: In vivo administration of "multi-walled" carbon nanotubes
activates the tumor-specific cytotoxic CD8+ T lymphocytes

Palavras-chave em Inglês: Carbon nanotubes, Lewis lung carcinoma, Immune
response

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Marcelo Lancelloti, Helder José Ceragioli

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidato: Adriel dos Santos Moraes

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2012

Título da Tese: Administração de Nanotubos de Carbono "Multiwalled" In Vivo Ativa Citotoxicidade Tumor-Específica De Linfócitos T CD8⁺.

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti:

Dr. Helder José Ceragioli:

*Essa dissertação é dedicada à minha família,
especialmente minha esposa Fran e meu filho
Fernando que me apoiaram incondicionalmente e
me deram motivações para superar todos os
obstáculos.*

Agradecimentos

Aos meus pais **Pedro e Deva** que são indiscutivelmente os grandes responsáveis pela minha formação em todos os aspectos. O apoio que tive de vocês permitiu que meus caminhos se direcionassem rumo a essa conquista.

À minha esposa **Fran** que me acompanhou e apoiou em minha trajetória. Agradeço muito pelo apoio, pelos conselhos e pelo seu companheirismo.

Ao meu filho **Fernando** que me inspira a seguir em frente sempre, superando todos os obstáculos que encontro em meu caminho.

Aos meus irmãos **Carolina, Pedro e Gabriela** que sempre acompanharam as etapas da minha vida e me ajudaram de diversas maneiras, seja por gestos, palavras ou ações.

Aos meus cunhados **Paulo, Aline, Taís, Ana Carolina** que sempre torceram por mim e me incentivaram.

Aos meus grandes amigos **Fernando Otacílio, Daniel, Wesley, Wander, Maurício e Gustavo** pela amizade incondicional e apoio constante e pelos conselhos dados em cada situação que enfrentei.

Ao **Claudionor e Marta** que sempre me ajudaram com conselhos e incentivos para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, **Prof Dr. Vitor Baranauskas** que me recebeu em sua equipe e me apoiou em todas as instâncias e situações.

Aos funcionários da FEEC: **Jaqueline, Noêmia, Edson e Mazé** pela ajuda recebida de cada um em todas as etapas desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Nanoengenharia e Diamantes: **Hudson, Dr. Alfredo Peterlevitz** que sempre me ajudaram em todos os momentos que precisei.

À **Prof Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos** por todo o apoio que me ofereceu e pelos direcionamentos no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço muito pela oportunidade que a Dra. me ofereceu, quando me acolheu como membro do laboratório de Neuroimunologia. Obrigado pelas sugestões dadas; obrigado pela liberdade de desenvolver meu trabalho em seu laboratório. Agradeço pelo exemplo de profissionalismo, amizade, lealdade. A Dra. é a minha referência e um dos principais pilares que sustentam essa nova etapa da minha vida profissional.

Aos membros do Laboratório de Neuroimunologia: **Alessandro, Rose, Fernando, Mariana, Felipe, Lidiane, Ingrid, Gabriela, Carlos Otávio, Denise, Balboa, Guilherme, Ana Leda, Elaine, Walkíria, Daniela** pela ajuda recebida de cada um, pela paciência e pelos momentos de trabalhos compartilhados.

Ao **Dr. Helder José Ceragioli** pela ajuda e pelas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes: **Marcos César, José Raimundo, Dirce, Marcelo, Antônio**. Muito obrigado pela ajuda que vocês me deram no desenvolvimento desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Às agências de fomento **CAPES, CNPQ e FAPESP** pelo apoio financeiro.

Epígrafe

Não fiques em terreno plano.

Não subas muito alto.

O mais belo olhar sobre o mundo

Está a meia altura

(Friedrich Nietzsche)

Resumo

A administração “in vivo” de nanotubos de carbono “multi-walled” (MWCNT’s), mesmo sem serem funcionalizados, estimula o aparecimento de uma resposta imune em camundongos normais. Nesse trabalho nós fornecemos evidências de que essas nanopartículas de carbono também estimulam a resposta imune em camundongos portadores de tumor. Os MWCNT’s (100 µg) diluídos em PBS contendo 0,1 % de Pluronic 127 foram inoculados sistemicamente em camundongos portando tumores cujos tamanhos atingiram 5 milímetros (mm) e a resposta imune foi avaliada nos linfonodos desses animais. Observamos que os tumores de animais que receberam as nanopartículas não cresceram como os tumores dos animais não tratados. A discreta inibição do crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) foi acompanhada pela ativação de linfócitos T CD8⁺ tanto em número quanto em função. A ativação da função citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ pode ser explicada pelo aumento da expressão de citocinas pertencentes à família da IL-12, principalmente IL-27, que é descrita como a citocina envolvida na estimulação da citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺. Nossos dados demonstraram que nanotubos de carbono “multi-walled”, mesmo sem funcionalização estimula resposta imunológica antitumoral.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono, Carcinoma pulmonar de Lewis, Resposta imune.

Abstract

The “in vivo” administration of multi walled carbon nanotubes (MWCNT’s) even without functionalization stimulates the immune response of naïve mice. Here we provide evidence that these carbon nanoparticles also stimulated the immune response of tumor-bearing mice. The MWCNT’s (100 µg) diluted in PBS with 0,1% of Pluronic 127 were inoculated systemically in mice with tumor that reached 5 mm and the immune response was evaluated in the lymph nodes. We observed that the tumors that received the nanoparticles did not grow as the untreated tumor. The discrete inhibition of the growth of the Lewis Lung Carcinoma (3LL) was accompanied by activation of CD8 T lymphocytes both in number and in function. The activation of the cytotoxic function of CD8 T lymphocytes may be explained by the increase of expression of cytokines belongs to the IL-12 family, mainly the IL-27, which is described as a cytokines involved in the stimulation of CD8 T lymphocytes cytotoxic function. Our data demonstrated that MWCNT even without functionalization stimulated the antitumor immune response.

Keywords: Carbon nanotubes, Lewis lung carcinoma, Immune response.

Sumário

Agradecimentos	v
Resumo	viii
Abstract	ix
I. Introdução geral	
1.1 - Nanotecnologia.....	2
1.2 - Nanotubos de carbono.....	5
1.3 - Biocompatibilidade dos nanotubos de carbono.....	8
1.4 - Sistema Imunológico.....	11
1.5 - Imunologia de Tumores.....	15
1.6 - Referências bibliográficas - Introdução geral	19
II. Apresentação do artigo intitulado:	
Administração nanotubos de carbono “multiwalled” <i>in vivo</i> ativa citotoxicidade tumor-específica de linfócitos T CD8 ⁺ e reduz ligeiramente o crescimento de carcinoma pulmonar em camundongos.	26
2.1- Introdução.....	27
II.1 Materiais e métodos	
2.1.1 – Preparação e caracterização de nanotubos de carbono MWCNT).....	29
2.1.2 - Animais.....	30
2.1.3 - Preparação de MWCNT para experimentos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	31
2.1.4 – Marcação de MWCNT.....	32
2.1.5 – Microscopia Confocal.....	33
2.1.6 – Citometria de Fluxo.....	33
2.1.7 - RT-PCR Quantitativo	33

2.1.8 – Análises Estatísticas.....	34
------------------------------------	----

II.2 Resultados

2.2.1 – Caracterização morfológica de nanopartículas de carbono através de análise do espectro Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FESEM) e Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (HRTEM).....	35
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2.2.2 – Administração “ <i>in vivo</i> ” de MWCNT inibe discretamente o crescimento do carcinoma pulmonar em camundongos.....	37
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2.2.3 – MWCNT’s são internalizados por macrófagos e estimulam a produção de citocinas pertencentes à família da IL-12.....	38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2.2.4 – MWCNT’s aumentam o número de linfócitos T CD8 ⁺ e a produção de Perforinas e Granzimas.....	40
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2.2.5 – MWCNT’s estimulam a atividade citotóxica de linfócitos T CD8 ⁺ contra células tumorais LLC.....	42
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

II.3 Discussão	43
-----------------------	-----------

II.4 Referências	46
-------------------------	-----------

III. Conclusões	49
------------------------	-----------

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Nanotecnologia

Embora o conceito de nanopartículas tenha sido criado na era moderna, a humanidade sempre teve contato com partículas em escalas nanométricas. Citando como exemplo, em meados do século IX, artesãos da Mesopotâmia, em um processo totalmente empírico, criavam vasos cujas superfícies eram recobertas com nanopartículas, criando brilho em seus artesanatos (1); incêndios ocasionais em florestas criam partículas nanométricas (2).

Essas partículas são geradas de várias maneiras podendo ser classificadas quanto à sua origem como nanopartículas incidentais ou nanopartículas estruturadas (2). As nanopartículas incidentais podem se originar a partir de atividades humanas (queima de combustíveis fósseis) ou espontaneamente por meio de algum fenômeno natural (incêndios em florestas). As nanopartículas estruturadas são geradas racionalmente pela humanidade, servindo a um propósito definido e pré-estabelecido. Nessa categoria encontramos ampla gama de compostos ou partículas confeccionadas em escala nanométrica: lipossomas, micelas poliméricas, nanocápsulas, nanoesferas, nanotubos de carbono, fulerenos, grafenos, dendrímeros, nanoemulsões, pontos quânticos, dentre outros. (1, 2, 3, 4, 5, 7). Embora recentemente começamos a nos preocupar e estudar o impacto das nanopartículas na saúde e no desenvolvimento da sociedade vale salientar que esses estudos ainda são incipientes e que há tempos estamos expostos a essas partículas: derivados da queima de combustíveis fósseis e incêndios (citados acima), alimentos contendo aditivos nanoparticulados como dióxido de titânio (TiO₂) e aluminossilicatos.

O desenvolvimento de partículas estruturadas só foi possível com o avanço tecnológico em várias áreas como: física, química, eletrônica, engenharia, ciências de materiais (4). Esse avanço ocorrido a partir do início do século XX levou ao surgimento de um novo ramo da ciência, conhecido como Nanotecnologia.

Nanotecnologia, cujo prefixo nano deriva do grego “anão”, é definida como a ciência e a engenharia envolvida na síntese, design, aplicação e caracterização de materiais, compostos ou partículas, com pelo menos uma de suas dimensões variando entre 0,1 a 100 nm (nanômetros) e tem como sua unidade funcional as nanopartículas (3,4). A palavra nanômetro indica a divisão de um metro por um bilhão sendo, portanto, a bilionésima parte do metro (3). Os materiais nanométricos possuem propriedades intrínsecas à sua condição que permitem aplicações nas mais diversas áreas: medicina (nanomedicina), biologia (nanobiologia), ciências dos materiais, engenharia eletrônica, ciências da computação (1, 2, 3, 6, 7). Uma das características mais marcantes dos materiais em escala nanométrica é a grande relação área/superfície que esses materiais possuem (7).

Devido a suas particularidades as nanopartículas geram um grande interesse na área da saúde, pois sua escala nanométrica possibilita o desenvolvimento de nanodispositivos e nanomateriais que interagem diretamente em nível subcelular dentro de um sistema biológico (3). Atualmente são desenvolvidas pesquisas em campos como: biosensores, diagnósticos e imagens, sistemas carreadores de drogas, genes e peptídeos (delivery-system), sistemas “scaffolds” bioativos (1, 2, 5). O grande interesse despertado para o desenvolvimento de “delivery-systems” ocorre devido à possibilidade de se estruturar carreadores nanométricos contendo fármacos ou outras moléculas bioativas. Essa combinação nanocarreador + fármaco/moléculas bioativas possui características específicas que podem potencializar a interação fármaco-alvo e diminuir efeitos colaterais. Por exemplo, um sistema carreador nanométrico permite que determinado fármaco seja colocados em maior quantidade no carreador, pois esse será entregue diretamente no local de interesse diminuindo assim a possibilidade de efeitos colaterais; o sistema “delivery-system” permite um aumento de meia vida do fármaco em questão, promove melhora na

estabilidade, concede proteção contra ambientes que podem ter efeito de degradação na molécula que está sendo transportada; drogas antitumorais associadas à nanocarreadores atingem o alvo de forma mais eficiente e controlada, e podem se acumular no tumor devido à presença de vasos fenestrados na massa tumoral, que possuem poros com tamanho menor que 200 nm permitindo assim que os nanocarreadores atravessem esses poros e “entreguem” a droga no local exato (1, 5, 7).

Embora a nanotecnologia se mostre um campo extremamente promissor, ainda falta consenso sobre os riscos que podem advir da produção em larga escala de materiais nanométricos, devido principalmente à baixa quantidade de estudos realizados. Alguns estudos toxicológicos indicam efeitos nocivos das nanopartículas, principalmente em âmbito ocupacional e ambiental. Nesses estudos foram elucidadas as principais vias de exposição à nanopartículas e posteriores consequências dessa exposição. As principais vias de acesso estudadas são: via oral, inalação, via dérmica, e parenteral (uso em aplicações biomédicas). Preocupações com aspectos de saúde pública em relação à incorporação da nanotecnologia no dia-a-dia estão começando a se firmar em todo o mundo, embora ainda falte muito para um consenso mundial sobre riscos que os materiais derivados da nanotecnologia podem apresentar (2,6).

Dentre todos os possíveis materiais nanométricos citados, os nanotubos de carbono (carbon nanotubes – CNT's) despertam grande interesse e atualmente são alvos de várias pesquisas com o intuito de aplicar suas propriedades físico-químicas únicas em campos variados como: eletrônica, engenharia de materiais e nanomedicina.

1.2 Nanotubos de Carbono

Em meados da década de 1980, um novo material composto por carbono, designado de fulereno, foi descrito. O fulereno C₆₀ apresenta uma estrutura icosaédrica com 32 faces sendo, 12 faces pentagonais e 20 faces hexagonais. Esse composto é mais uma forma alotrópica do carbono, além do grafite e diamante e, após sua descoberta, grande interesse foi gerado e inúmeras pesquisas realizadas em relação aos fulerenos (9). Nesse contexto, no início da década de 90, mais precisamente em 1991, os nanotubos de carbono (CNT's) foram observados pela primeira vez. Nesse ano Sumio Iijima publica um artigo no qual descreve uma nova estrutura finita de carbono, que se constitui de tubos em forma de agulhas, com diâmetro variando de 4 a 30 nm e comprimento de até 1 micrômetro (μm). Essa nova estrutura recebe o nome de nanotubos de carbono (CNT's) e mais um campo de pesquisa se abre em relação à essa nova forma alotrópica (10).

OS CNT possuem interessantes propriedades óticas, mecânicas e eletrônicas, o que gera pesquisas nas mais diversas áreas no intuito de utilizá-los como: sensores químicos e biológicos, pontas para microscópios de força atômica (MFA), emissores de elétrons, armazenadores de gases (por exemplo, o hidrogênio), sistemas carreadores (“delivery-systems” - que podem carrear fármacos, peptídeos, RNA, DNA), elementos de reforço em compósitos, “scaffolds” para crescimento de células ósseas e no tratamento de tumores (11, 12, 13, 14).

Os CNT's são compostos por folhas de grafite (grafenos) que se enrolam formando uma estrutura oca tubular de forma cilíndrica com 1 átomo de espessura. Essas folhas de grafite são formadas por átomos de carbono ligados entre si em uma estrutura semelhante à anéis hexagonais condensados. Dependendo do arranjo desses átomos ao longo da superfície tubular, os CNT's podem ser metálicos ou semicondutores. Dependendo da quantidade de folhas de grafeno que se

enrolam concentricamente sobre o próprio eixo, os nanotubos podem apresentar variações nos números de paredes. As estruturas que apresentam apenas uma parede (uma camada de grafeno) são chamadas de nanotubos de paredes simples (Single-Wall Carbon Nanotubes – SWCNT's); as que apresentam duas camadas são denominadas nanotubos de parede dupla (Double-wall Carbon Nanotubes – DWCNT's) e finalmente quando existem mais de duas folhas de grafeno enroladas concentricamente os nanotubos são chamados de nanotubos de múltiplas paredes (Multi-Wall Carbon Nanotubes – MWCNT's). Os primeiros nanotubos observados por Sumio Iijima foram os MWCNT e eles foram encontrados durante um processo de síntese similar à síntese de fulerenos, chamado de método de descarga por arco elétrico. OS SWCNT possuem geometria simples e podem variar o seu diâmetro de 0,4 nm à 3,0 nm e o comprimento da ordem de 20-1000 nm; Os MWCNT apresentam diâmetros entre 1,4 à 1000 nm, com comprimento podendo atingir de 1 à vários micrômetros (10 - 12, 15 - 17).

Em relação à sua síntese, os CNT's podem são obtidos a partir de três métodos diferentes, que ocasionam variações tanto no tipo de CNT's gerados (SWCNT, DWCNT ou MWCNT), como no rendimento obtido e no grau de pureza dos nanotubos de carbono: método por descarga de arco elétrico, ablação por laser e deposição química à partir da fase de vapor (10, 18 - 20).

Todos esses métodos compartilham uma característica em comum que é a adição de energia em uma fonte de carbono com o intuito de fragmentar essa fonte produzindo átomos de carbono isolados ou fragmentos, que se recombinarão gerando CNT's. A fonte de energia pode ser eletricidade (descarga por arco elétrico), um feixe de laser de alta intensidade (ablação pó laser) ou calor de um reator (deposição química por vapor) (20). O método por descarga de arco elétrico é realizado em uma atmosfera de gás inerte entre dois eletrodos de carbono que podem ser puros ou conter catalisadores. Através desses eletrodos é gerada uma descarga elétrica que

atinge temperaturas superiores à 3000 °C, resultando na deposição de CNT's (que são formados na presença de catalisadores apropriados – ferro, cobalto ou níquel) sobre um substrato. Esse método é barato porem apresenta algumas desvantagens como: alta quantidade de impurezas geradas durante o processo de síntese; difícil controle das características dos nanotubos. (10, 12, 20, 21, 22). O método por ablação a laser consiste em irradiação de um feixe de laser em grafite contendo catalisadores apropriados. Com temperaturas atingindo mais de 3000° C ocorre geração de átomos ou fragmentos de carbono provenientes do grafite, seguida da formação de nanotubos de carbono (12, 20, 21, 22). É um método caro e no final do processo aparecem muitas impurezas como partículas de grafites e metais. O método de deposição química a vapor (CVD) foi descrito em 1993 por Yacaman e colaboradores. Esse método envolve a decomposição de compostos de carbono gasosos ou voláteis (metano, monóxido de carbono, acetileno, etileno, benzeno, xileno e outros hidrocarbonetos) catalisada por nanopartículas metálicas, que servem como pontos de nucleação para o crescimento de nanotubos de carbono. É o método mais usado para a produção comercial de CNT's, pois diferente dos outros dois métodos citados, a técnica de CVD permite um “scale-up” para produção industrial. Também é um método que apresenta maior controle durante sua execução, resultando em CNT's com menores níveis de impurezas.

Os parâmetros mais importantes que permitem esse controle no CVD são: pressão do reator, temperatura do substrato no qual crescerá o CNT's, tipo de gás ou solvente utilizado e o tipo de catalisador. Embora os CNT's obtidos por CVD tenham menor quantidade de impurezas quando comparados aos métodos de descarga por arco elétrico e ablação por laser, ainda pode haver a necessidade de remoção desses resíduos indesejados; para isso a técnica mais comumente usada é o tratamento com ácidos fortes (HNO₃ e H₂SO₄), que limpa os CNT's de impurezas como resíduos de catalisadores e formas amorfas de carbono (18 – 26). Para a caracterização

estrutural, morfológica e análise de pureza dos CNT's, várias técnicas são usadas em conjunto complementando umas às outras. Os nanotubos provenientes de fontes comerciais geralmente são acompanhados de análises como: espectros Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise termogravimétrica (TGA), análise elementar de dados. A espectroscopia Raman é considerada a técnica óptica dominante para se analisar os CNT's, devido à grande sensibilidade do método e a característica intrínseca dos nanotubos, que emitem um grande sinal Raman (27,28).

1.3 Biocompatibilidade dos Nanotubos de Carbono

Devido às várias possibilidades de uso dos CNT's na medicina, estudos começaram a ser realizados no intuito de investigar o papel desempenhado pelos mesmos dentro de sistemas biológicos. A principal característica revelada pelos estudos é a necessidade de funcionalização dos nanotubos de carbono, através de várias técnicas diferentes e com resultados variados que atendam a um objetivo específico. Essas funcionalizações são realizadas através de reações químicas nas paredes, pontas dos CNT's, ou mesmo por encapsulamento fazendo com que estes se tornem mais solúveis e, conseqüentemente, com maior poder de interação entre meios orgânicos, inorgânicos e meios biológicos (11, 12, 14– 16). Para a funcionalização dos CNT's podem ser realizadas reações covalentes e não covalentes. Dimitrios Tasis et al. (2006) e Maurizio Prato et al. (2008) mostraram várias formas de funcionalização que podem ser aplicadas aos CNT's: halogenação nas paredes dos CNT's, reações de cicloadição, oxidação, amidação, inserção de moléculas dentro dos nanotubos, adição de radicais, revestimentos dos CNT's com polímeros. As técnicas de funcionalização dos CNT's com radicais orgânicos aumentam as possibilidades dos nanotubos atravessarem as membranas celulares, permitindo a entrega de

fármacos e outras moléculas dentro do citoplasma ou até mesmo no núcleo. Dentre todas as possibilidades de funcionalização, as duas mais utilizadas atualmente são os processos químicos de oxidação com ácidos fortes e ultrassonicação (resultando na presença de hidroxilas e/ou carboxilas nas paredes laterais dos nanotubos) e os processos de adição de radicais (que permite a inserção de radicais de interesse nas paredes e pontas dos CNT's). Com essas funcionalizações os nanotubos apresentam maior solubilidade em água, ocorre aumento na dispersão dos CNT's e, posteriormente, é possível o acoplamento de moléculas como proteínas, DNA, RNA, fármacos, peptídeos, que se ligam nos radicais atachados nos nanotubos de carbono (15, 29, 30). Desde a descoberta dos CNT's na década de 90 muitos estudos foram publicados sobre a utilização desse material em sistemas biológicos embora até hoje não exista consenso sobre a forma que os nanotubos atravessam as membranas celulares e se internalizam atingindo o citoplasma e/ou o núcleo. Em um artigo publicado em 2005, Alberto Bianco et al. inferem que a internalização dos CNT's ocorrem através de um processo passivo e independente da via endocítica (29,30). No mesmo ano, os pesquisadores Nadine Wong Shi Kam and Hongjie Dai publicam os estudo afirmando que os CNT's se internalizam nas células através de um processo endocítico dependente de energia (31). Outro estudo realizado no ano de 2008 (Seishiro Hirano et al.) mostra que os MWCNT's, pelo menos em parte, se ligam à receptores MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) presentes na membrana de macrófagos e posteriormente são fagocitados. Os receptores MARCO pertencem à família de receptores "scavengers" e desempenham um importante papel na fagocitose de partículas ambientais não opsonizadas. Esse mesmo estudo demonstra que os MWCNT promovem danos nas membranas dos macrófagos após a sua ligação com os receptores MARCO (32).

Além da falta de consenso em relação à forma que os CNT's são internalizados pelas células, outras questões permanecem controversas quando se estuda esse material: sua toxicidade e sua capacidade de induzir resposta imunológica quando introduzidos em sistemas biológicos.

Uma das principais preocupações que envolvem o uso de nanotubos de carbono é em relação ao desconhecimento do impacto sobre a saúde de trabalhadores envolvidos na fabricação e manuseio desse material. Estudos realizados mostram que os CNT's podem levar à danos no DNA, danos em células pulmonares (presença de granulomas, infiltrados inflamatórios) (33,35). CRAIG A. POLAND et al. mostraram que os MWCNT's podem apresentar citotoxicidade semelhante ao asbesto, dependendo principalmente da forma e comprimento dos nanotubos. Nesse trabalho foi detectado o surgimento de processo inflamatório com aparecimento de leucócitos polimorfonucleares e exudato proteico, após a inoculação intraperitoneal de 50 µg de MWCNT em camundongos (34).

Em um trabalho publicado por nossa equipe (Grecco et al. – 2011), mostramos que os CNT's estimulam as funções dos macrófagos levando a um aumento na expressão de interleucina 12 (IL 12), resultando assim em uma série de eventos que ativam a resposta imunológica celular (Th1) e a produção de anticorpos (36).

Um estudo publicado em 2007 (Kateb e colaboradores) mostra que a internalização de MWCNT por macrófagos e células tumorais, não alteram o perfil de expressão de citocinas nem a capacidade de proliferação dessas células. Nesse mesmo estudo foi avaliada a capacidade dos CNT's em ligar DNA e siRNA e carregá-los dentro de células da microglia, mostrando a viabilidade do uso desses nanotubos como carreadores em terapia anticâncer (37). Embora ainda não exista consenso sobre os efeitos tóxicos e sobre os efeitos exercidos pelos CNTs sobre o sistema imunológico, intensas pesquisas são realizadas no intuito de se aproveitar todo o

potencial desse material como carreador biológico de drogas antitumorais e como nanodispositivos que podem ajudar na detecção precoce do câncer (38-40).

1.4 Sistema Imunológico

O sistema imunológico desempenha uma função vital em todos os organismos multicelulares, coordenando e efetuando reações contra substâncias estranhas, células senescentes, micróbios, contra células anormais que eventualmente surgem no próprio organismo e contra macromoléculas (proteínas, polissacarídeo). Esse sistema é composto por células e por moléculas que desempenham suas funções protegendo o hospedeiro contra as ameaças citadas. Essas reações são denominadas resposta imunológica ou resposta imune. A imunologia é a ciência que estuda o sistema imunológico em toda a sua extensão (aspectos moleculares e aspectos celulares) e, para um melhor entendimento, as respostas imunológicas são classificadas em duas: resposta imunológica inata (também chamada de resposta imunológica natural) e resposta imunológica adaptativa (chamada de resposta imunológica adquirida) (41-42).

A resposta imune inata possui três funções importantes: é a linha de defesa inicial do organismo contra infecções por micróbios; seus mecanismos efetores têm capacidade de eliminar micro-organismos; ela estimula a resposta adaptativa e influencia na natureza e desenvolvimento da mesma, tornando-a mais efetiva. Outras duas características inerentes a esse tipo de resposta é que ela é efetuada apenas contra micro-organismos e, seu padrão no desenvolvimento dessa resposta é sempre o mesmo (41).

Os principais componentes da resposta imune inata são: barreiras físicas e químicas (epitélios e moléculas antimicrobianas produzidas pelas superfícies epiteliais); células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos células dendríticas) e natural killers (células NK); proteínas sanguíneas

(sistema complemento e mediadores de inflamação) e citocinas (proteínas que regulam e coordenam atividades das células componentes da resposta imune) (41). Os componentes da resposta imune inata reconhecem estruturas características que são compartilhadas por microrganismos patógenos. Tais estruturas incluem ácidos nucleicos (RNA fita dupla presente em vírus no estágio de replicação, sequências não metiladas de CpG DNA presentes em bactérias), proteínas características encontradas em micro-organismos, complexos lipídicos e/ou de carboidratos (LPS em bactérias Gram negativas, ácido teicóico em bactérias Gram positivas). Essas estruturas compartilhadas por micro-organismos recebem o nome de PAMP's (pathogen-associated molecular patterns) e as células participantes da resposta imune inata possuem vários receptores específicos que reconhecem esses padrões moleculares. Esses receptores são expressos nas superfícies das células (ex, Macrophage mannose receptor – MMR; Macrophage scavenger receptor - MSR), em compartimentos intracelulares (ex, Proteína quinase – PKR; Toll like receptors -TLR) e podem ser secretados na corrente sanguínea e em fluidos tissulares (ex, Mannan-binding lectin -MBL, C-reactive protein - CRP, e Serum amyloid protein – SAP). As principais funções desses receptores incluem opsonização, ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação, fagocitose, ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, e indução de apoptose (43).

A resposta imune adquirida ou adaptativa tem como principais características a memória imunológica após exposição prévia a um determinado antígeno, uma alta especificidade e diversidade dessa resposta, especialização, autolimitação e capacidade de não reagir a moléculas e/ou células do próprio organismo. Essas características permitem que a resposta imune adaptativa aumente sua magnitude e sua capacidade defensiva toda vez que há repetição na exposição de um antígeno que já tenha entrado em contato anteriormente com o organismo.

Outro ponto importante da resposta adquirida é a capacidade de reconhecer um grande número de substâncias não provenientes de microrganismos, além daquelas originadas pelos microrganismos (41). A resposta imune adaptativa pode ser subdividida em: resposta imune humoral e resposta imune celular. A resposta imune humoral é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B. Esses anticorpos circulam na corrente sanguínea e estão presentes nas secreções provenientes de mucosas. A principal função dos anticorpos é a neutralização da capacidade infecciosa de microrganismos, além do reconhecimento de antígenos microbianos. A resposta imune celular é mediada por linfócitos T, células apresentadoras de antígenos (APCs), células efetoras bem como os produtos gerados pelas mesmas. Há diferentes subpopulações de linfócitos que diferem na maneira como é efetuado o reconhecimento de antígenos. Os linfócitos B expressam em sua superfície, receptores específicos (BCR) e, como citado anteriormente, tem a capacidade de produção de anticorpos. Os linfócitos T não são capazes de produzir anticorpos e expressam em sua superfície, receptores específicos denominados TCR. Esses linfócitos consistem em subpopulações funcionalmente distintas: T helper $CD4^+$ e T citotóxico $CD8^+$ (CTL's) (41). A principal diferença existente entre os linfócitos B e linfócitos T em termos de reconhecimento de antígenos, é que os primeiros reconhecem peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e pequenos produtos químicos, enquanto que os linfócitos T reconhecem como antígeno apenas os peptídeos dispostos numa sequência primária de aminoácidos. Para o reconhecimento do peptídeo pela célula T, é fundamental que ele esteja unido a uma forma alélica das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do próprio indivíduo, expressa na superfície das células apresentadoras do antígeno (APC's) (41,44). As APC's (células dendríticas, macrófagos ou linfócitos B) convertem antígenos protéicos em peptídeos e os acoplam a moléculas de MHC, gerando o primeiro sinal indispensável para a ativação de

linfócitos T. O MHC garante que as células T só reconheçam antígenos proteicos associados a uma célula, e que o tipo certo de célula T (helper - CD4⁺ ou citotóxicas - CD8⁺) responda de maneira eficiente. Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos ligados moléculas MHC de classe II enquanto os T CD8⁺ reconhecem antígenos ligados em moléculas MHC de classe I. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas APC's (40; 44). As principais moléculas co-estimulatórias estudadas são as CD 152 (CTLA4) e CD 28 que estão presentes nos linfócitos e CD 80 e CD 86 presentes nas células apresentadoras de antígenos. A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como anergia. Há concordância na literatura que o sinal dado pela molécula CD28 influencia positivamente a ativação linfocitária, enquanto o sinal dado pela molécula co-estimulatória CTLA4 (CD152) é negativo na ativação de linfócitos (45).

Após a apresentação dos antígenos pelas APC's, é iniciada uma sucessão de eventos que resultará em ativação linfocitária. Produtos solúveis produzidos pelos linfócitos são extremamente importantes nesse processo de ativação. Os linfócitos T helper CD4⁺ secretam alguns tipos de citocinas que os diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th1 e Th2. Mais recentemente, um terceiro subtipo foi descrito, os linfócitos T helper17. Linfócitos CD4⁺ do tipo Th1 secretam citocinas que apresentam atividade pró-inflamatória como: IL-2, IFN γ e TNF α , que medeiam as reações de hipersensibilidade tardia e induzem a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas pelos linfócitos B. Linfócitos CD4⁺ do tipo Th2 produzem citocinas antiinflamatórias e secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Eles estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgG 1 e IgE pelos linfócitos B. As células Th0 produzem um padrão combinado de citocinas Th1 e Th2, enquanto o subtipo designado Th3, identificado na mucosa intestinal, produz quantidades consideráveis de fator transformador de proliferação (TGF β)

(46,47). Vários fatores que ocorrem no momento da interação entre células como o microambiente em que se desenvolve essa interação APC's + linfócitos, as citocinas expressas nesse microambiente, o tipo de células apresentadoras que entram em contato com linfócitos influenciam a diferenciação do subtipo de resposta Th1 ou Th2 (48).

1.5 Imunologia de Tumores

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública mundial, e é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade que afligem crianças e adultos (40). Atualmente está bem estabelecida e aceita a teoria de que a presença de fenômenos intrínsecos a células autônomas determinam o aparecimento precoce do câncer. As características presentes nas células tumorais são: capacidade proliferativa descontrolada (essas células produzem fatores de crescimento que as estimulam; perdem a capacidade de responder a sinais inibitórios de crescimento), habilidade de invadir tecidos e se metastizar (replicando descontroladamente e criando novos vasos sanguíneos em um processo denominado angiogênese) (40,49). Essas transformações celulares são iniciadas por fatores genéticos e epigenéticos que ativam oncogenes e suprimem mecanismos supressores de tumor (50). As células tumorais, apesar de derivadas do próprio organismo, são capazes de eliciar resposta imunológica devido a presença de antígenos expressos em sua superfície e esses antígenos são reconhecidos como “não próprios” mas a presença das características descritas acima permitem que essas células consigam sobrepujar a vigilância imunológica do organismo ocorrendo assim a progressão dos tumores. O conceito de vigilância imunológica foi introduzido na década de 50 por Mcfarlane Burnet e postula que algumas funções fisiológicas do sistema imunológico são o reconhecimento e destruição de clones provenientes de células transformadas antes delas se transformarem em tumor e, a

destruição de tumores antes deles crescerem desordenadamente (40,49). As células tumorais conseguem escapar das respostas imunológicas inatas e adaptativas (vigilância imunológica) através de processos conhecidos como *imuno edição* (também chamado de *imuno seleção*) e *subversão imune*. Na *imuno edição* ocorre seleção de células tumorais não imunogênicas enquanto que na *subversão imune* ocorre supressão ativa da resposta imunológica (49). O processo de *imuno edição* é extremamente dinâmico e compreende três fases, a saber: eliminação (consiste na remoção direta ou indireta de células malignas pelas células do sistema imune), equilíbrio (é a fase de latência após a remoção incompleta de células tumorais pelo sistema imune) e escape (aparecem células tumorais não imunogênicas que escapam da vigilância imunológica) (50).

A presença de antígenos específicos tumorais permite a montagem de uma resposta imunológica contra essas células anormais, pelo menos até a fase de equilíbrio. Esses antígenos tumorais podem ser produtos de oncogenes mutados e genes supressores de tumor; produtos de outros genes mutados; proteínas celulares com expressão aberrantes ou superexpressas; antígenos tumorais produzidos por vírus oncogênicos; antígenos oncofetais; glicoproteínas e glicolipídeos expressos alteradamente na superfície celular; antígenos de diferenciação do tipo específico de tecidos (40). Os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$ - CTL's) desempenham um importante papel no combate a células tumorais, reconhecendo e neutralizando células potencialmente malignas que expressam peptídeos derivados de proteínas celulares alteradas, ou proteínas virais oncogênicas. Essas estruturas alteradas são processadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC's) e são apresentadas associadas com moléculas de MHC classe I. Muitos estudos mostram que um alto número de linfócitos T infiltrados no tumor indica um bom prognóstico. Após o contato com antígenos apresentados, os linfócitos naive T $CD8^+$ rapidamente se diferenciam em linfócitos

efetores T CD8⁺ (CTL's) produzindo citocinas como IFN γ , aumentando a expressão de receptores em sua superfície (FasL) e produzindo moléculas químicas efetoras de citotoxicidade: perforinas e granzimas. É importante ressaltar que os linfócitos T CD4⁺ também atuam no momento de diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ produzindo citocinas (por exemplo IFN γ) que direcionarão a formação desses linfócitos citotóxicos (CTL's). Essa atuação por parte das T CD4⁺ é dividida em três fases: fase de indução da formação dos CTL's, fase de manutenção da reposta por parte dos CTLs e fase de formação e manutenção das células de memória (CTL's de memória) (40, 49, 51, 53). Outro fator crucial para a formação dos CTL's é a presença da interleucina 27 (IL-27), pertencente à família da IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27). Ela é uma proteína heterodimérica produzida pelas APC's, composta pelas subunidades EB13 (EBV-induced 3) e p28 (que é homóloga à subunidade p35 presente na IL-12), e atua em diferentes tipos de células que expressam um complexo de receptores denominados IL-27R. Similarmente a IL-12, ela apresenta potente atividade antitumoral através de mecanismos indiretos como: indução de Linfócitos T CD8⁺ e NK; inibição da angiogênese primária dos tumores. A IL-27 atua ativando os fatores de transcrição STAT 1-5, Tbet e EOMES aumentando assim a produção de perforinas e granzimas pelos CTL's. (52,54-56). As perforinas e granzimas são importantes moléculas químicas efetoras da ação citotóxica via que os CTLs apresentam contra seus alvos. Os linfócitos citotóxicos quando ativados apresentam em seu citoplasma organelas com funções de armazenamento e de secreção denominadas lisossomas, que armazenam em seu interior perforinas (proteínas com capacidade de formar poros em membranas) e granzimas (pertencentes á família das serinas proteases). Quando os CTL's interagem com sua célula alvo, ocorre exocitose e o conteúdo dos grânulos é liberado na sinapse imunológica. As perforinas permeiam a membrana citoplasmática das células alvo e promovem a entrada das granzimas, que iniciam o processo de apoptose

através da ação sobre as caspases (proteínas citosólicas que contem resíduos de cisteína e desempenham tanto funções pró-inflamatórias quanto função promotora de apoptose) (57-60).

Referências bibliográficas – Introdução Geral

- (1) LAROUÏ H, WILSON DS, DALMASSO G, SALAITA K, MURTHY N, SITARAMAN SV, MERLIN D. Nanomedicine in GI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (300): G371-G383, 2011.
- (2) STEPHAN T STERN AND SCOTT E. MCNEIL. Nanotechnology safety concerns Revisited. *Toxicological Sciences* 101 (1), 4-21, 2008.
- (3) GABRIEL A. SILVA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol* (61):216-20, 2004
- (4) BEG S, RIZWAN M, SHEIKH AM., HASNAIN MS, ANWER K, KOHLIA K. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (63): 141–163, 2011.
- (5) ZOLNIK BS, FERNÁNDEZ AG, SADRIEH N, DOBROVOLSKAIA MA. Minireview: nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151 (2):458–465, February 2010.
- (6) PAUTLER M, BRENNER S. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. *International Journal of Nanomedicine* (5): 803–809, 2010.
- (7) KIM BYS, RUTKA J T, CHAN WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med* 363:2434-43, 2010.
- (8) ADAIR JH, PARETTE MP, ALTINOGLU EI, KESTER M. Nanoparticulate Alternatives for Drug Delivery. *ACSnano* Vol 4 n° 9: 4967-4970, 2010.
- (9) KROTO HW, HEATH JR, O'BRIEN SC, CURL RF, SMALLEY RE. C60 buckminsterfullerene. *Nature*, (vol 318): 162-163, 1985.
- (10) IJIMA S. Helical Microtubules of graphitic carbon. *Nature*, (vol 354): 56-58, 1991.
- (11) SOUZA FILHO AG, FAGAN SB. Funcionalização de nanotubos de carbon. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 7, 1695-1703, 2007.

- (12) BALASUBRAMANIAN K, BURGHARD M. Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small* 1, n° 2, 180–192, 2005.
- (13) MU Q, BROUGHTON DL, YAN B. Endosomal leakage and nuclear translocation of multiwalled carbon nanotubes: developing a model for cell. *Nano Lett.*, Vol. 9, No. (12): 4370-4375, 2009.
- (14) PATLOLLA AK, HUSSAIN SM, SCHLAGER JJ, PATLOLLA S, TCHOUNWOU PB. Comparative study of the clastogenicity of functionalized and non-functionalized multi-walled carbon nanotubes in bone marrow cells of swiss-webster mice. *Environ Toxicol.* December ; 25(6): 608–621, 2010 doi:10.1002/tox.20621.
- (15) TESIS D, TAGMATARCHIS N, BIANCO A, PRATO M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev* (106): 1105-1136, 2006.
- (16) SAITO N, USUI Y, AOKI K, NARITA N, SHIMIZU M, HARA K, OGIWARA N, NAKAMURA K, ISHIGAKI N, KATO H, TARUTA S, ENDO M. Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chem. Soc. Rev.* (38): 1897–1903, 2009.
- (17) DRESSELHAUS M., DRESSELHAUS G, EKLUND P, SAITO R. Carbon nanotubes. *Phys World.* 33-38, 1998.
- (18) VAJTAI BR, WEI BQ, AJAYAN PM. Controlled growth of carbon nanotubes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* (362): 2143–2160, 2004.
- (19) YACAMAN MJ, YOSHIDA MM, RENDON L, SANTIESTEBAN JG. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Appl Phys Lett.* (62): 202-204, (1993).
- (20) DONALDSON K, AITKEN R, TRAN L, STONE V, DUFFIN R, FORREST G, ALEXANDER A. Carbon Nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences* 92(1): 5–22, 2006.

- (21) CASSELL AM, RAYMAKERS JA, KONG J, DAI H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem.* (103): 6484-6492, 1999.
- (22) POPOV VN. Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering R.* (43):61-102, 2004.
- (23) SINNOTT SB, ANDREWS R, QIAN D, RAO AM, MAO Z, DICKEY EC, DERBYSHIRE F. Model of carbon nanotube growth through chemical vapor deposition. *Chemical Physics Letters* (315): 25–30, 1999.
- (24) ENDO BM, HAYASHI T, KIM YA, TERRONES M, DRESSELHAUS MS. Applications of carbon nanotubes in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* (362): 2223–2238, 2004.
- (25) ZHANG ZJ, WEI BQ, RAMANATH G, AJAYAN PM. Substrate-site selective growth of aligned carbon nanotubes. *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 77, No. 23, 4 December 2000.
- (26) JOSELEVICH E, DAI H, LIU J, HATA K, WINDLE AH. Carbon-nanotube synthesis and organization. *Carbon Nanotubes, Topics Appl. Physics* 111, 101–164 2008.
- (27) JORIO A, KAUPPINEN E, HASSANIEN A. Carbon-nanotube metrology. *Carbon Nanotubes, Topics Appl. Physics* 111, 63–100 2008.
- (28) ZHAO BQ, WAGNER HD. Raman spectroscopy of carbon-nanotube-based composites. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* (362), 2407–2424, 2004.
- (29) BIANCO A, KOSTARELOS K, PRATO M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, (9):674–679, 2005.
- (30) PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A. Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Design and Discovery. *Accounts of Chemical Research* Vol. 41, No. 1: 60-68, January 2008.

- (31) KAM NWS, LIU Z, DAI H. Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* (45):577–581, 2006.
- (32) HIRANO S, KANNO S, FURUYAMA A. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* (232): 244–251, 2008.
- (33) SMART SK, CASSADY AI, B, LU GQ, MARTIN DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* (44):1034–1047, 2006.
- (34) POLAND CA, DUFFIN R, KINLOCH I, MAYNARD A, WALLACE WAH, SEATON A, STONE V, BROWN S, MACNEE W, DONALDSON K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos like pathogenicity in a pilot study. *nature nanotechnology* VOL 3, JULY 2008. doi:10.1038/nnano.2008.111.
- (35) FIRME CP, BANDARU PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: NBM* 2010, (6):245-256, doi:10.1016/j.nano.2009.07.003
- (36) GRECCO AC ET AL. Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology*; 22(26):265103, 2011.
- (37) KATEB B, HANDEL MV, ZHANG L, BRONIKOWSKI MJ, MANOHARA H, BADIEA B. Internalization of MWCNTs by microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors cancer *NeuroImage* (37): S9–S17, 2007.
- (38) NIE S, XING Y, KIM GJ, SIMONS JW. Nanotechnology applications in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (9):257–88, 2007.
- (39) PASTORIN G. Crucial functionalizations of carbon nanotubes for improved drug delivery: a valuable option? *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, No. 4, April 2009.

- (40) LIU Z, CHEN K, DAVIS C, SHERLOCK S, CAO Q, CHEN X, DAI H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res* 2008;68: (16). August 15, 2008.
- (41) ABBAS AK, LICHTMAN AH. Cellular and molecular immunology. Elsevier, 5th Ed, 2003.
- (42) SCHWARTZ M AND COHEN IR. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunology Today*; (21): 265-268, 2000.
- (43) JANEWAY CA, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* (20): 197-216, 2002.
- (44) MCDEVITT HO. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Ann Rev Immun.* (18):1-17, 2000.
- (45) LENSCHOW DJ, WALUNAS TL, BLUESTONE JA. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Ann. Review of Immun;* (14): 233-258, 1996.
- (46) MOSSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA AND COFFMAN RL. Two types of murine T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*; (136): 2348-2357, 1986.
- (47) CHEN Y, KUCHROO VK, INOBE J, HAFLER DA AND WEINER HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*; (265):1237-1240, 1994.
- (48) ROMAGNANI S. T cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*; (85):9-18, 2000.
- (49) ZITVOGEL L, TESNIERE A, KROEMER G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology* Vol (6); 715-727, October 2006.

- (50) STAGG J, JOHNSTONE RW, SMYTH MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy *Immunological Reviews* Vol. (220): 82–101, 2007.
- (51) HAMAI A, BENLALAM H, MESLIN F, HASMIM M, CARRÉ T, AKALAY I, JANJI B, BERCHEM G, NOMAN MZ, CHOUAIB S. Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? © 2010 John Wiley & Sons A/S · *Tissue Antigens* (75): 1–8. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01401.x
- (52) MORISHIMA N, MIZOGUCHI I, OKUMURA M, CHIBA Y, XU M, SHIMIZU M, MATSUI M, MIZUGUCHI J, YOSHIMOTO T. A pivotal role for interleukin-27 in CD8+ T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2010, Article ID 605483.
- (53) YU P, FU YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory Investigation* (86): 231–245, 2006.
- (54) JANKOWSKI M, KOPINSKI P, GOC A. Interleukin-27: biological properties and clinical application. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (58):417–425, 2010.
- (55) CLAUDIA COCCO, NICOLA GIULIANI, EMMA DI CARLO, ET AL. IL-27 acts as multifunctional anti-tumor agent in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* (16): 4188 August 15 2010.
- (56) XU M, MIZOGUCHI I, MORISHIMA N, CHIBA Y, MIZUGUCHI J, YOSHIMOTO T Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical and Developmental Immunology* Article ID 832454, 9 pages, 2010. doi:10.1155/2010/832454

(57) BARRY M, BLEACKLEY RC. Cytotoxic T Lymphocytes: all roads lead to death. Nature Reviews Immunology Vol (2); 401-409, June 2002.

(58) TRAPANI JA, SMYTH MJ. Functional Significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nature Reviews Immunology Vol (2); 735-747, October 2002.

(59) RUSSELL JH, LEY TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu. Rev. Immunol. (20):323-70, 2002.

(60) LIEBERMAN J. The ABC of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nature Reviews Immunology Vol (3); 361-370, May 2003.

Capítulo II

Administração nanotubos de carbono “multiwalled” *in vivo* ativa citotoxicidade tumor-específica de linfócitos T CD8⁺ e reduz ligeiramente o crescimento de carcinoma pulmonar em camundongos

2.1 Introdução

Aplicações biomédicas para nanotubos de carbono estão sendo intensamente investigadas devido às características desses materiais que apresentam uma combinação de tamanho e propriedades físico-químicas extremamente úteis (1,2). No combate aos tumores os nanotubos de carbono têm um grande potencial em amplas áreas como: diagnósticos por imagens; como “delivery-system” atuando no fornecimento de agentes farmacológicos ou de moléculas como DNA; participando do silenciamento de genes com RNA de interferência; transportando oligonucleotídeos e/ou proteínas para o tratamento ou detecção de determinados tipos de câncer (3). Entretanto, poucos estudos estão abordando o efeito dos nanotubos de carbono sem nenhum tipo de funcionalização em modelos experimentais de tumores em animais. Recentemente, demonstramos que nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT's) não funcionalizados, estimulam tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa em camundongos normais. O sistema imunológico pode tanto promover como suprimir o crescimento de tumores (4). Na literatura já está bem estabelecido que a inflamação crônica predispõe ao surgimento do câncer (5). Citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-1 (IL-1) e a Interleucina-6 (IL-6) são consideradas essenciais na progressão tumoral (6). Por outro lado, um número elevado de linfócitos T intratumorais prediz sobrevivência à longo prazo em pacientes com determinados tipos de tumores, sugerindo uma resposta antitumoral imunitária (7,8). Linfócitos T CD4⁺ “tumores-específicos” orquestram a resposta imunológica contra o câncer. Esses linfócitos T CD4⁺ são necessários para a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, mediada por citocinas (9,10) Linfócitos T CD8⁺, também conhecidos como linfócitos T citotóxicos (CTL's), desempenham um papel fundamental no controle de vários tipos de cânceres (11,12). A ativação de linfócitos T citotóxicos pode ser explicada pela ação de inúmeras e

potentes citocinas imunoregulatórias, que são geradas durante a resposta imune inata e funcionam como um link funcional entre a resposta imune inata e resposta imune adaptativa. As citocinas que pertencem à família IL-12 (IL-12, IL-23 e IL-27) são particularmente importantes na ativação de células T citotóxicas (CTL's). A família de citocinas pertencentes a IL-12 foi avaliada em vários tumores pré-clínicos, revelou-se que esta citocina exerce efeitos anti-tumorais potentes contra vários modelos de tumor (13). Os efeitos anti-tumorais de IL-27 pode ser explicado principalmente devido aos seus efeitos sobre a ativação das células NK (natural-killers) e ativação de linfócitos T CD8⁺ (14-16).

No presente estudo, apresentamos evidências de que a administração *in vivo* de nanotubos de carbono (MWCNT's) não funcionalizados reduz ligeiramente o crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). A redução do crescimento do tumor foi acompanhado pelo aumento de IL-12 e IL-27 e aumento da quantidade de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos com atividade contra células tumorais. Estes resultados indicam que, mesmo sem funcionalização prévia, o MWCNT desempenha um papel importante contra o desenvolvimento tumoral, devido à sua capacidade de estimular a resposta imunológica no sistema imune.

Materiais e métodos

2.1.1 Preparação e Caracterização de Nano tubos de Carbono

Os Nanotubos de Carbono Multiwalled usados nessa pesquisa foram preparados no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), pertencente ao Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP (FEEC). Os MWCNT's foram sintetizados pelo método de deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente (HFCVD), crescido em substrato de cobre. Esse substrato é composto por folhas de cobres polidas ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) com espessura de 0,5 mm (4). Antes da deposição dos MWCNT's, os substratos foram revestidos com solução de polianilina e posteriormente secos sobre uma placa de aquecimento no ar a 373 K durante 120 min. Depois de secos, esses substratos foram umedecidos com 0,2 ml de uma solução de nitrato de níquel (2 g l^{-1}) diluído em acetona. Após esse processo eles foram imersos durante 30 min na câmara de reação do sistema de HFCVD e alimentados com vapor de cânfora diluída em propanona (20 g l^{-1}). Dois gases carreadores diferentes foram usados na câmara do reactor: hidrogênio (Vol 14,5%) e nitrogênio (85% vol.). A pressão total no sistema se manteve em 27 mbar e uma vazão total de cerca de 100 centímetros cúbicos por segundo (sccm) foram mantidos ao longo do processo de obtenção dos MWCNT's. A temperatura, medida por um termopar colocado no lado de baixo do substrato de cobre, foi mantida a 723 K. Durante a síntese de MWCNT's pelo método de HFCVD, foram formados sobre a superfície superior do substrato uma espécie de "filme" de MWCNT's. Estes "filmes" foram facilmente retirados no final do processo, devido à diferença existente entre o coeficiente térmico de dilatação dos MWCNT's e do cobre. Os "filmes" de

MWCNT's foram tratados durante 20 min com ultrassonicação levando à produção de um pó de MWCNT's com nanotubos de carbono apresentando cerca de 1000 nm de comprimento e 60-80 nm de diâmetro, aberto em ambas as extremidades. Os MWCNT's foram caracterizados por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM - field emission scanning electron microscope) e microscopia eletrônica de alta resolução (HRTEM- high resolution transmission electron microcope). Os espectros Ramam foram registrados a temperatura ambiente usando um sistema Renishaw e empregando um laser de argônio ($\lambda = 514.5$ nm), com potência de cerca 6 mW. As análises morfológicas das amostras foram feitas como uso de FESEM usando um microscópio JEOL JSM-6330F operado a 5 kV e 8 μ A e com o uso de HRTEM usando um JEOL 3010.

2.1.2 Animais

Camundongos C57BL/6 foram obtidos originalmente a partir do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA) e atualmente são estabelecidos como uma colônia no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmeas com idades variando de 6 a 8 semanas. Durante o período de seguimento adotado neste estudo, os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com tampa de metal e maravalha, alimentados com ração industrializada e água “ad libitum”, com temperatura mantida entre 21° e 23°C com um ciclo de 12h de luminosidade e 12h de escuro, no biotério do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Unicamp sob condições convencionais. Os animais foram separados randomicamente nos grupos de estudos (grupo tratamento e grupo controle). Todos os procedimentos foram

realizados de acordo com as diretrizes propostas pelo Conselho Brasileiro de Proteção Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP.

2.1.3 Preparação de MWCNT para experimentos *in vitro* e *ex vivo*

Para os ensaios *in vitro*, os MWCNT's foram tratados termicamente a 250 ° C durante 2h, no intuito de remover possíveis endotoxinas contaminantes. Após a esterilização, os MWCNT's (1 mg) foram suspensos em 1 mL de solução salina de tampão de fosfato estéril (PBS) com 0,1% de Pluronic 127 (F 127) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e sonificados por 20 minutos. O uso do Pluronic 127 justifica-se uma vez que sua capacidade tensoativa reduz as interações hidrofóbicas e melhora a solubilidade das preparações contendo nanotubos de carbono [4]. Para a obtenção de macrófagos injetou-se tioglicolato intraperitoneal em camundongos e após 3 dias o líquido intraperitoneal foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Após a centrifugação as hemáceas foram lisadas com solução de cloreto de amônio a 0.82%. As células em suspensão foram lavadas novamente com solução de Hanks, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina a 0.2mM, 4,25mg/ml de gentamicina e 2-mercaptoetanol na diluição 1:5000 (meio completo). Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o método de exclusão com azul de Trypan.

Para ensaios *in vivo*, os MWCNT's sonificados e esterilizados foram suspensos em PBS estéril (PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2}) com 0,1 % de Pluronic 127, a uma concentração de 100 $\mu\text{g}/100 \text{ uL}$ por animal e essa solução foi continuamente agitada em vórtex até a inoculação por via intravenosa através do plexo orbital. As células do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) foram doadas pela Dr. Giselle Longo. Após descongelamento, as células foram mantidas em garrafas de cultura (2-3 X 10⁶ células/garrafa) e cultivadas com meio de cultura completo {suplementado

com 0,5% de piruvato e 1% de MEM (MEM aminoácidos não essenciais, Invitrogen, EUA)} As garrafas de cultura foram mantidas em estufa com temperatura de 37 ° C e 5% de tensão de CO₂, durante 24 horas. O meio foi substituído a cada 48 horas, e as células foram colhidas após 144 horas de incubação. Um total de 10⁶ células LLC foi injetado por via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6. Quando os tumores atingiram 5 mm de diâmetro (dia 12), os animais foram distribuídos aleatoriamente entre grupo controle e grupo de tratamento com MWCNT's (5 animais por grupo). Os tamanhos dos tumores foram medidos utilizando um paquímetro os volumes foram calculados utilizando a seguinte fórmula: Total V (mm³) = (largura² × comprimento) / 2.

2.1.4 Marcação de MWCNT

Os MWCNT's foram marcados com kit para coloração contendo um corante vermelho fluorescente (PKH26; Sigma Aldrich, MO, EUA). O kit contém o corante PKH26, que é um corante vermelho fluorescente, atóxico e hidrofóbico, e o Diluent C, que é um diluente específico para essa marcação. Os MWCNT's foram primeiramente diluídos no Diluent C e posteriormente foi acrescentado o corante PKH26; em seguida realizou-se uma incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Os nanotubos corados foram então lavados três vezes com PBS e centrifugados a 120.000 g durante 4 horas em uma temperatura de 4 °C. Em seguida foram ressuspensos em PBS contendo 0,1% de Pluronic 127 na concentração de 1 mg/ml. Esta preparação de MWCNT foi usada nas primeiras 24 horas após a marcação dos MWCNT's com o corante.

2.1.5 Microscopia Confocal

Um microscópio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta foi usado para estudo de imagem fluorescente. As células (macrófagos) foram plaqueadas em lamínulas de vidros juntamente com os MWCNT's corados. Após as 24 horas de incubação as lamínulas foram então fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas com PBS. Para montagem, utilizou-se o corante nuclear DAPI na diluição 1:100. Um laser de argônio com comprimento de onda de 488 nm foi utilizado para excitar o corante PKH26.

2.1.6 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada para detecção de MWCNT's corados em macrófagos; para a análise da população de linfócitos T CD 8⁺ em células colhidas dos linfonodos e para a análise da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ sobre as células tumorais (3LL). Os macrófagos foram incubados com MWCNT's (10 ug / ml) durante 4 h à 37 ° C. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes e analisados por um citômetro de fluxo. Os dados foram adquiridos (10.000 a 30.000 células) em um citômetro FACSCanto (BD Biosciences) e analisados usando o software FACSDiva (BD Biosciences).

2.1.7 RT-PCR Quantitativo

O RNA mensageiro das células de baço e linfonodos foi extraído usando Trizol (Applied Bioscience, EUA) de acordo com o fabricante. Foi realizada a transcrição reversa (RNAm em cDNA) usando um kit denominado High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) . A análise foi realizada com Taqman um ABI Prism 7500 Sequence Detector Taqman (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha). Os *primers* β -actina, IL-12, IL-27,

perforina 1 e granzima B, foram obtidas a partir da lista do fabricante Applied bioscience. A β -actina foi utilizada como controle interno. O nível de expressão de cada transcrito foi avaliado sempre em relação ao resultado da análise de expressão realizada na mesma amostra, nas mesmas condições e ao mesmo tempo. Os dados foram obtidos por medições independentes realizadas em duplicatas (cinco animais / grupo).

2.1.8 Análises Estatísticas

A significância estatística dos resultados foi determinada usando a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis ou o teste de Mann-Whitney. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

2.2.1 Caracterização morfológica de nanopartículas de carbono através de análise do espectro Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FESEM) e Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (HRTEM).

A Figura 1 (A) mostra imagens FESEM típicas das partículas de nano tubos assim que depositadas. As barras de escala são de 10 a 1000 nm. As imagens ilustram claramente que as amostras depositadas consistem em nanotubos “multiwalled” não alinhados e uniformes, que cobrem a superfície do substrato com uma aglomeração formando um emaranhado. As Figuras 1 (B) e (C) apresentam uma imagem HRTEM típica que mostra a natureza da estrutura dos MWCNT's. A Figura 1 (D) mostra um espectro típico de Raman dos MWCNT's. Este espectro pode ser dividido em regiões de frequências de primeira e segunda ordem. Na região de primeira ordem aparecem dois picos intensos em 1344 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} , correspondentes ao pico de desordem sp^2 (linha D) e ao pico de grafite altamente orientada $\text{E}_{2g}\text{ sp}^2$ (linha G). Na região de segunda ordem, há um pico intenso em 2687 cm^{-1} que corresponde ao segundo harmônico da linha D ($2 \times \text{D}$), um pequeno pico em torno de 2921 cm^{-1} , que corresponde à soma das frequências das linhas D e G ($\text{D} + \text{G}$), e um pequeno pico em torno de 3202 cm^{-1} , que corresponde ao segundo harmônico da linha G ($2 \times \text{G}$). A intensidade do pico D é maior quando comparada à intensidade do pico G correspondente, o que não indica um alto grau de ordem C-C sp^2 , correspondendo aos espectros Raman de nanotubos de carbono desordenados de paredes múltiplas.

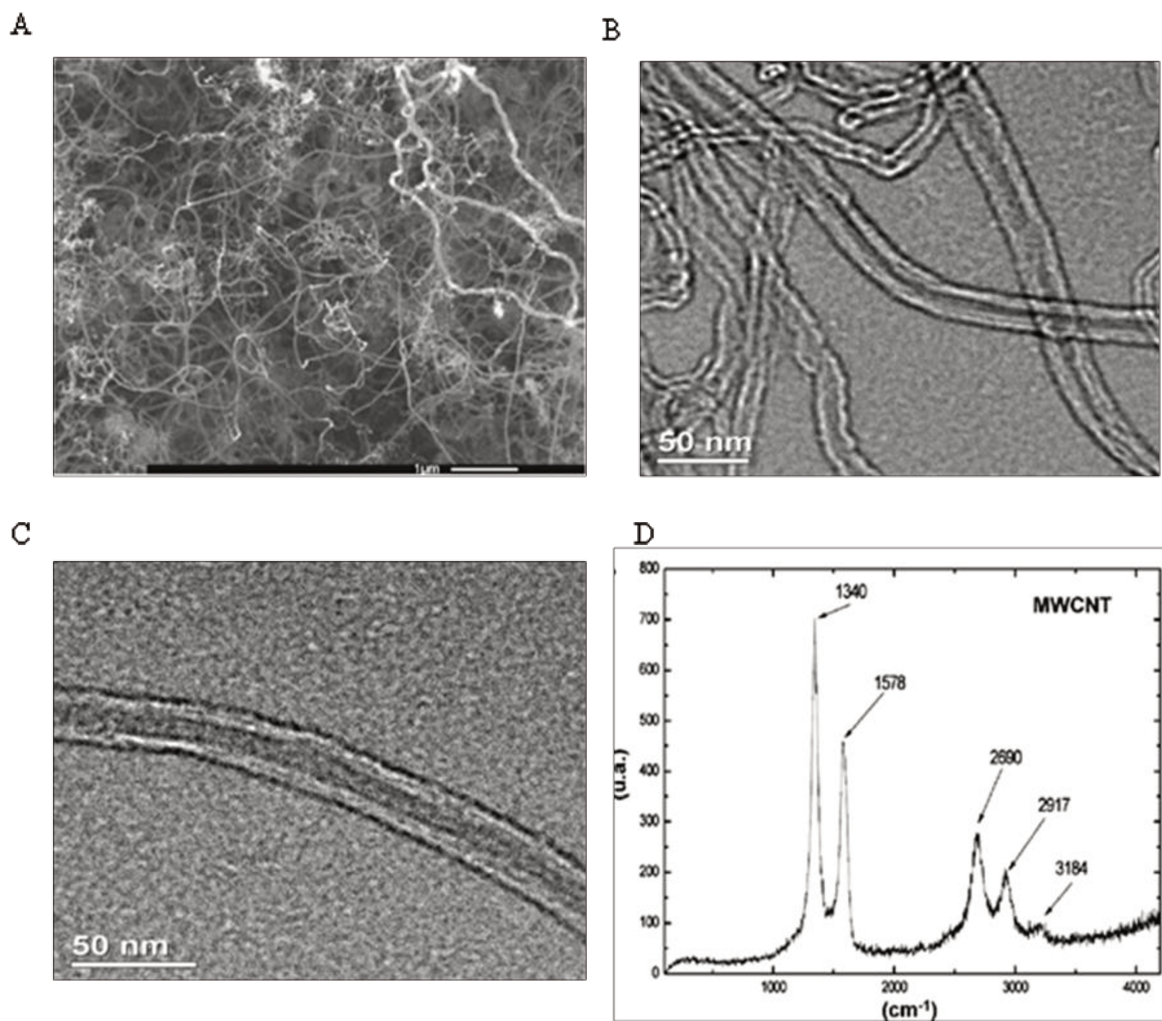


Figura 1. FESEM (A) e HRTEM ((B) e (C)), mostrando a natureza da estrutura dos MWCNT's. Espectro típico da análise por espectroscopia Raman dos MWCNT (D).

2.2.2 Administração “in vivo” de MWCNT inibe discretamente o crescimento do carcinoma pulmonar em camundongos.

MWCNT's esterilizados e dispersos com Pluronic F127 0,1% em PBS (1 mg/mL) foram administrados sistemicamente em camundongos portadores de tumor. O crescimento do tumor foi reduzido nos indivíduos que receberam 100 ug de MWCNT's / animal em relação aos animais não tratados. O efeito de MWCNT foi seguido por pelo menos uma semana e uma redução do crescimento tumoral LLC foi observado (Figura 2).

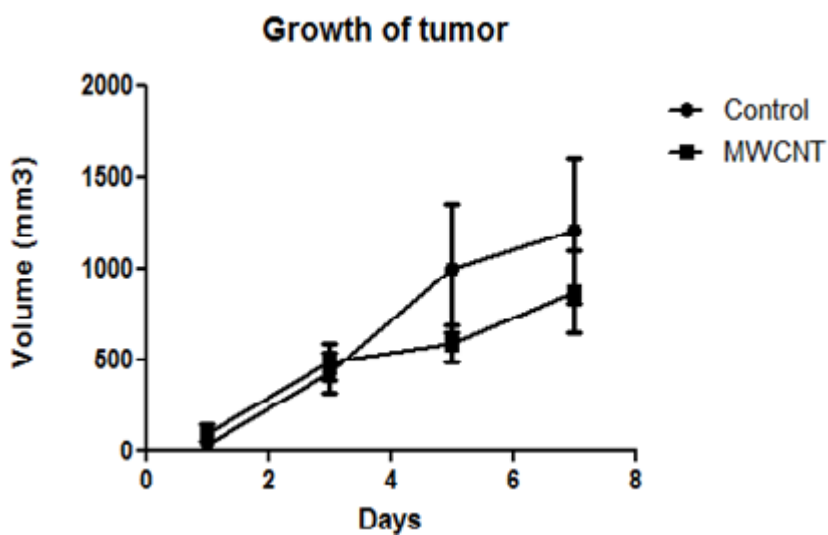


Figura 2. Crescimento tumoral após administração de MWCNT's em animais com tumor.

2.2.3 MWCNT's são internalizados por macrófagos e estimulam a produção de citocinas pertencentes à família da IL-12.

Para investigar o efeito dos nanotubos de carbono sobre a função de macrófagos, os MWCNT's corados com corante fluorescente foram incubados com macrófagos peritoneais e a internalização foi avaliada por citometria de fluxo e microscopia confocal. A figura 3A demonstra através de microscopia confocal que os macrófagos internalizaram MWCNT's corados com PKH26 (cor vermelha). A internalização dos MWCNT's também foi demonstrada através da citometria de fluxo (figura 3B). A internalização de nanopartículas ativa os macrófagos levando a um aumento na expressão das citocinas IL-12 e IL-27 (figura 3C).

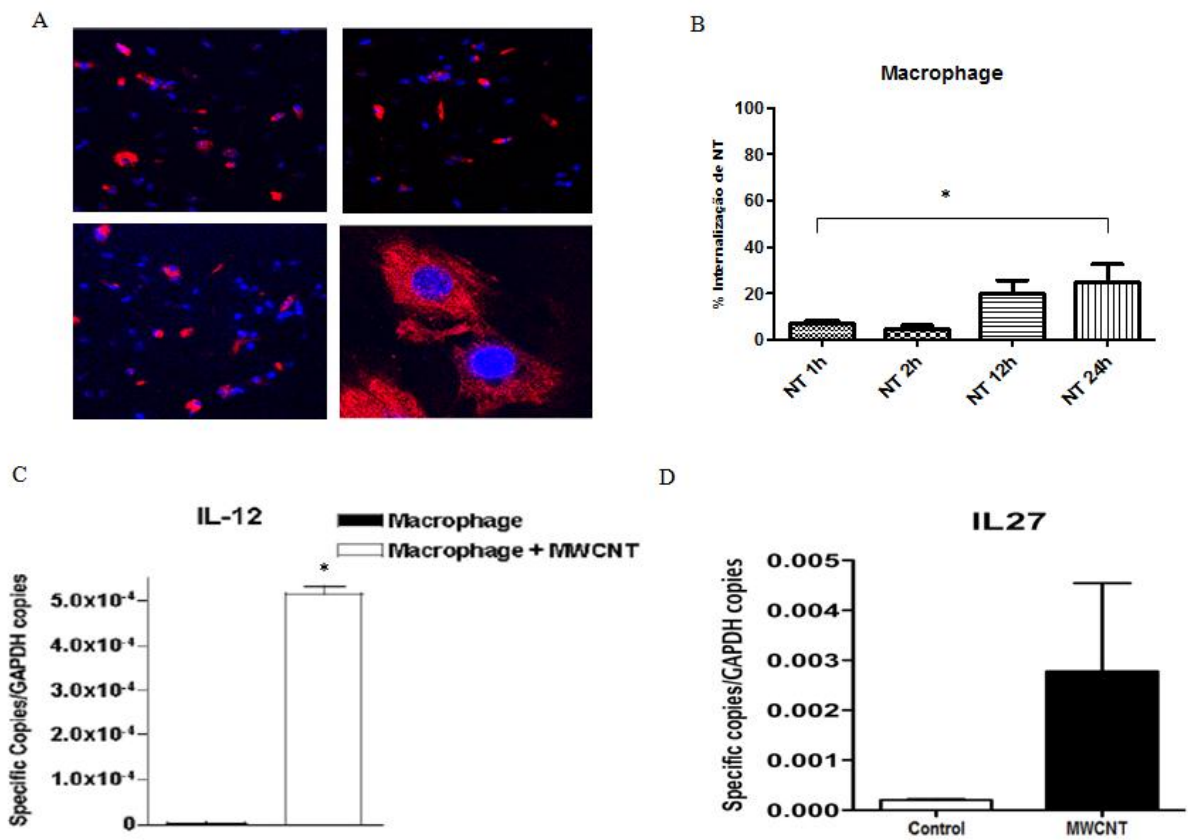


Figura 3. MWCNT's corados com corante PKH26 (vermelho) são internalizados por macrófagos (A). Porcentagem de MWCNT's corados com corante PKH26 internalizados por macrófagos (analisado por citometria) (B). Expressão de mRNA de citocinas IL-12 e IL-27. * ($p < 0,005$) (C).

2.2.4 MWCNT's aumentam o número de linfócitos T CD8⁺ e a produção de Perforina 1 e Granzima B.

Os linfócitos citotóxicos são as principais células do sistema imune envolvidas na eliminação de células tumorais (1,2). Este experimento foi realizado para demonstrar o efeito no número e na função da população de linfócitos T CD8⁺, após a administração de MWCNT's em animais portadores de tumor. A figura 4A mostra o aumento significativo no número de linfócitos T CD8⁺ provenientes de linfonodos de camundongos portadores de tumor tratados com MWCNT's, em relação ao grupo controle (animais com tumor sem tratamento com MWCNT's). A Figura 4B mostra que a administração de MWCNT's também aumenta significativamente a expressão de perforina e em menor grau a produção de granzima B.

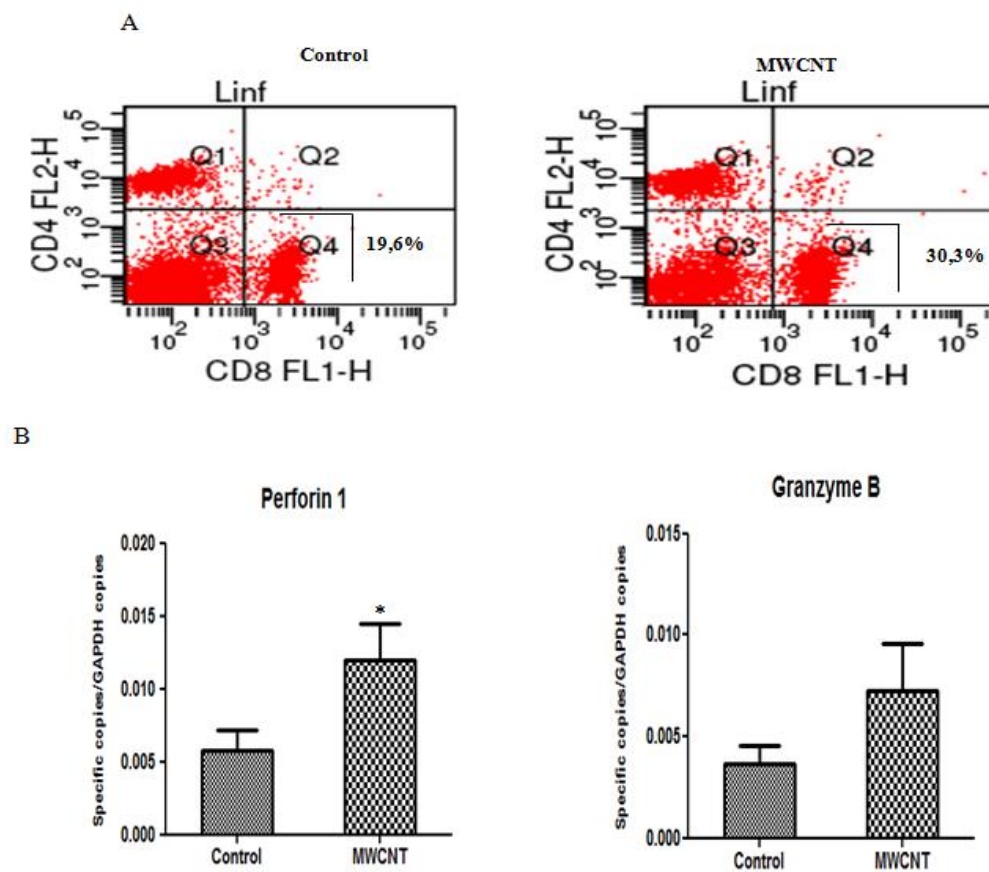


Figura 4. Aumento no número de linfócitos T CD8⁺ em linfonodos de animais portadores de tumor tratados com MWCNT's, em relação ao grupo de animais não tratados (grupo controle) (A). Administração de MWCNT's aumenta significativamente a expressão de Perforina 1 ($p < 0,05$) e em menor grau a produção de Granzima B (B).

2.2.5 MWCNT's estimulam a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ contra células tumorais LLC.

Para confirmar se os linfócitos T CD8⁺ são citotóxicos para as células do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), esses linfócitos foram retirados de linfonodos de animais portadores de tumor que receberam MWCNT's (grupo tratado) e de animais portadores de tumor que não receberam MWCNT's (grupo controle). Essas células foram co-cultivadas com células LLC durante 4 h. Após este período de tempo, as células tumorais foram coradas com anexina para avaliar a apoptose. A figura 5 demonstra que os linfócitos T CD8⁺ de camundongos portadores de tumor tratados com nanotubos de carbono induzem apoptose de maneira significativa em relação aos linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos portadores de tumor sem tratamento com MWCNT.

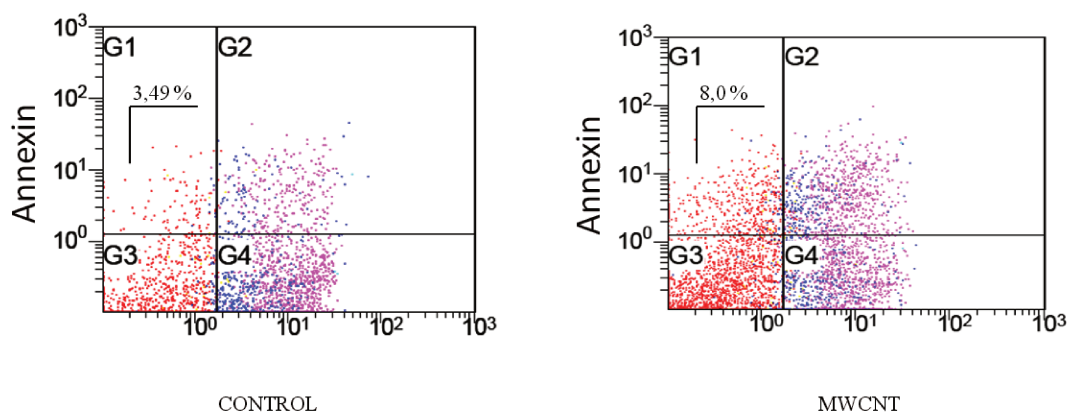


Figure 5. Linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos portadores de tumor tratados com MWCNT's induzem mais apoptose nas células LLC (Lewis Lung Carcinoma) do que os linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos portadores de tumor sem o tratamento com MWCNT's (*in vitro*).

Discussão

No presente estudo apresentamos evidências de que a administração *in vivo* de Nanotubos de Carbono “Multiwalled” (MWCNT’s) ativa a função citotóxica de linfócitos T CD8⁺ em animais portadores de tumor. Muitos estudos abordam sobre a importância de nanoestruturas de carbono em modelos experimentais de câncer. No entanto, poucos estudos analisam o efeito de nanotubos de carbono não funcionalizados dentro de um sistema biológico. Uma vez que essas nanoestruturas estimulam uma resposta imunológica, nós conduzimos alguns experimentos no intuito de entender o efeito dessas nanopartículas sobre a resposta imunológica de animais portadores de tumor. Nós mostramos claramente que os linfócitos provenientes de animais portadores de tumor que receberam MWCNT’s expressam de maneira significativa mais citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-27 do que animais portadores de tumor que não receberam MWCNT’s. Essas citocinas produzidas pelas células na resposta imunológica inata estabelecem um link com a resposta imunológica adaptativa. Notavelmente, IL-12 induz a produção de IFN- γ pelas populações de linfócitos T e/ou pelas células natural killer (NK) (17), e tem demonstrado potente atividade antitumoral dependente de IFN- γ em modelos de tumores. Além disso, atualmente a IL-12 está sendo investigada em pacientes com vários tipos de tumores sólidos (18,19). Alguns estudos descreveram outras duas citocinas heterodiméricas (IL-23 and IL-27) que estão estruturalmente relacionadas com a IL-12, e em termos de função essas duas citocinas complementam as atividades da IL-12 na coordenação e regulação da iniciação,

expansão e manutenção da resposta imune adaptativa mediada por células T (20). Nesse trabalho nós demonstramos que a administração de MWCNT's aumenta a expressão de duas citocinas pertencentes à família da citocina IL-12 (IL-12 e IL27) e aumenta o número de linfócitos T CD8⁺ nos linfonodos de animais portadores de tumor. Essa observação está de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o efeito antitumoral mediado pela citocina IL-27 leva a um aumento dramático no número de linfócitos T CD8⁺ em linfonodos (21). Esse aumento no número de linfócitos T CD8⁺ mediado pelos MWCNT's foi acompanhado pelo aumento da função desses linfócitos, com um aumento significativo de Perforina 1 e, em menor grau de Granzima B. Além disso esse trabalho fornece evidências de que linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos portadores de tumor tratados com MWCNT's induzem apoptose nas células tumorais (LLC) quando colocados em co-cultura durante 4 horas. Nesse processo, a Perforina 1 (proteína formadora de poro) e a Granzima B (protease citotóxica) são lançadas do citoplasma onde se encontravam dentro de grânulos para a sinapse imunológica que ocorre entre os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e as células do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). As granzimas são um conjunto altamente conservado de proteases de serina. Depois que elas são lançadas nas células tumorais alvo, elas podem clivar proteínas celulares levando a destruição dessas células através da indução de apoptose (21). Dessa maneira, nossos dados indicam que a administração *in vivo* de MWCNT's ativa os linfócitos T CD8⁺ que conseqüentemente induzem apoptose em células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Embora não fomos capazes de estabelecer o efeito direto da IL-27 na ativação de linfócitos T CD8⁺, o fato de que a expressão desta citocina está aumentada nos linfonodos de animais portadores de tumor que receberam MWCNT's sugere que ela pode desempenhar um papel importante nesse processo. Nossas observações estão em acordo com estudos prévios que demonstraram que a redução tumoral induzida por IL-27 é

criticamente dependente da ação de linfócitos T CD8⁺ (21, 22). Tomadas em conjunto, esse trabalho fornece evidências de que os MWCNT's, mesmo sem funcionalização, estimulam a expressão de citocinas pertencentes à família da IL-12, as quais estão envolvidas na estimulação de linfócitos T citotóxicos com relevante reposta imuno antitumoral.

Referências

1. KLUMPP C, KOSTARELOS K, PRATO M, BIANCO A. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochim Biophys Acta*. 2006 ;1758(3):404-12.
2. PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc Chem Res*. 2008 ;41(1):60-8.
3. ELHISSI AM, AHMED W, HASSAN IU, DHANAK VR, D'EMANUELE A. Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery. *J Drug Deliv*. 2012;2012:837327.
4. GRECCO AC, PAULA RF, MIZUTANI E, SARTORELLI JC, MILANI AM, LONGHINI AL, OLIVEIRA EC, PRADELLA F, SILVA VD, MORAES AS, PETERLEVITZ AC, FARIAS AS, CERAGIOLI HJ, SANTOS LM, BARANAUSKAS V. Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology*. 2011;22(26):265103.
5. BALKWILL F AND MANTOVANI A INFLAMMATION AND CANCER: BACK TO VIRCHOW? *Lancet* 2002; 357:539-545
6. MICHAEL DOUGAN, DANAN LI, DONNA NEUBERG, MARTIN MIHM, PAUL GOOGE, KWOK-KIN WONG, GLENN DRANOFF .A dual role for the immune response in a mouse model of inflammation-associated lung cancer *J Clin Invest*. 2011; 121(6): 2436–2446.
7. ELIZABETH D. THOMPSON, HILDA L. ENRIQUEZ, YANG-XIN FU, VICTOR H. ENGELHARD Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors *J Exp Med*. 2010 ; 207(8): 1791–1804.
8. M STUMPF, A HASENBURG, M-O RIENER, U JÜTTING, C WANG, Y SHEN, M ORLOWSKA-VOLK, P FISCH, Z WANG, G GITSCH, M WERNER, S LASSMANN. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes *Br J Cancer*. 2009; 101(9): 1513–1521.
9. YING XIE, AKGÜL AKPINARLI, CHARLES MARIS, EDWARD L. HIPKISS, MALCOLM LANE, EUN-KYUNG M. KWON, PAWEL MURANSKI, NICHOLAS P.

- RESTIFO, PAUL ANDREW ANTONY. Naive tumor-specific CD4⁺ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma *J Exp Med*. 2010; 207(3): 651–667.
10. ZUQIANG LIU, HAE S. NOH, JANET CHEN, JIN H. KIM, LOUIS D. FALO, JR., ZHAOYANG YOU. Potent Tumor-Specific Protection Ignited by Adoptively Transferred CD4⁺ T Cells *J Immunol*. 2008; 181(6): 4363–4370.
 11. PING YU, YOUJIN LEE, YANG WANG, XIAOJUAN LIU, SOGYONG AUH, THOMAS F. GAJEWSKI, HANS SCHREIBER, ZHAOYANG YOU, CAMPBELL KAYNOR, XINZHONG WANG, YANG-XIN FU. Targeting the Primary Tumor to Generate CTL for the Effective Eradication of Spontaneous Metastases *J Immunol*. 2007; 179(3): 1960–1968.
 12. RODOLFO D. VICETTI MIGUEL, THOMAS L. CHERPES, LEAH J. WATSON, KYLE C. MCKENNA CTL Induction of Tumoricidal Nitric Oxide Production by Intratumoral Macrophages Is Critical for Tumor Elimination *J Immunol*. 2010 ; 185(11): 6706–6718.
 13. XU M, MIZOGUCHI I, MORISHIMA N, CHIBA Y, MIZUGUCHI J, YOSHIMOTO T. Regulation of antitumor immune response by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23 and IL-27 *Clin Dev Immunol*. 2020; 1-9 review
 14. R. SALCEDO, J. K. STAUFFER, E. LINCOLN, ET AL., IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8⁺ T cells, *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 12, pp. 7170–7182, 2004.
 15. Y. SHINOZAKI, S. WANG, Y. MIYAZAKI, ET AL., Tumor-specific cytotoxic T cell generation and dendritic cell function are differentially regulated by interleukin 27 during development of anti-tumor immunity, *International Journal of Cancer*, 2009; 124:1372–1378,
 16. M. MATSUI, T. KISHIDA, H. NAKANO, ET AL., Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity, *Cancer Research*, 2009; 69: 2523–2530,
 17. G. TRINCHIERI, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3: 133–146,

18. BRUNDA MJ, LUISTRO L, WARRIER RR, ET AL. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med.* 1993;178(4):1223–1230
19. GATELY MK, RENZETTI LM, MAGRAM J, ET AL. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology.* 1998;16:495–521
20. R. A. KASTELEIN, C. A. HUNTER, AND D. J. CUA, Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation, *Annual Review of Immunology*, 2007;25: 221–242,
21. MORISHIMA N, OWAKI T, ASAKAWA M, KAMIYA S, MIZUGUCHI J, YOSHIMOTO T. Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *Journal of Immunology.* 2005;175(3):1686–1693.
22. SALCEDO R, HIXON JA, STAUFFER JK, ET AL. Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow. *Journal of Immunology.* 2009;182:4328–4338.

Capítulo III

Conclusões

- ✓ Os macrófagos tem a capacidade de internalizar os nanotubos de carbono “multiwalled” (MWCNT's);
- ✓ Após a internalização dos nanotubos de carbono, ocorre um aumento na expressão de citocinas pertencentes à família das IL-12;
- ✓ O aumento da expressão de IL-12 e IL-27 pelas células apresentadoras de antígenos leva a uma ativação tanto no número da população linfocitária quanto nas funções dos linfócitos citotóxicos T CD8⁺ (CTL's);
- ✓ Os CTL's ativados aumentam a expressão de Perforina 1 e Granzima B, promovendo um maior combate às células tumorais;
- ✓ A administração sistêmica de MWCNT's em animais portadores de tumor provoca aumento da citotoxicidade tumor específica de linfócitos T CD8⁺.