



UNICAMP

ROSEMEIRE FLORENÇA DE OLIVEIRA DE PAULA

**EFFECT OF ADMINISTRATION OF CARBON NANOTUBES IN
THE IMMUNE RESPONSE OF MICE WITH CARCINOMA**

***EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOTUBOS DE
CARBONO NA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS
PORTADORES DE CARCINOMA DE PULMÃO***

**CAMPINAS
2012**

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ROSEMEIRE FLORÊNÇA DE OLIVEIRA DE PAULA

**Effect of administration of carbon nanotubes in the immune
response of mice with carcinoma**

Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

***EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO NA
RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE CARCINOMA
DE PULMÃO***

*Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Clínica Médica da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de
Mestra em Clínica Médica área de concentração Clínica Médica*

*Master 's Dissertation presented to the Internal Medicine Pos
graduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, for
obtainment of the Ph.D. degree in Internal Medicine, specialization in Internal Medicine*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/ TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ROSEMEIRE
FLORÊNÇA DE OLIVEIRA DE PAULA E
ORIENTADA PELA PROFA. LEONILDA
MARIA BARABOSA DOS SANTOS**

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink is written over a horizontal dashed line. The signature is cursive and appears to be "L. M. B. dos Santos".

**Campinas
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

P281e Paula, Rosemeire Florêça de Oliveira de, 1969-
Efeito da administração de nanotubos de carbono na
resposta imune de camundongos portadores de
carcinoma de pulmão / Rosemeire Florêça de Oliveira
de Paula. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Leonilda Maria Barbosa dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nanotubos de carbono. 2. Adenocarcinoma. 3.
Sistema imunológico. 4. Citocinas. I. Santos, Leonilda
Maria Barbosa dos, 1950-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of administration of carbon nanotubes in the immune response of mice with carcinoma.

Palavras-chave em inglês:

Nanotubes carbon

Adenocarcinoma

Immune system

Cytokines

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Leonilda Maria Barbosa dos Santos [Orientador]

Marcelo Lancelloti

Paula Cristina de Souza Souto

Data da defesa: 11-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

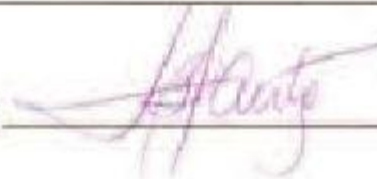
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

ROSEMEIRE FLORÊNÇA DE OLIVEIRA DE PAULA

Orientadora **PROFA. DRA. LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS**

Membros:

1. **PROFA. DRA. LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS**



2. **PROFA. DRA. PAULA CRISTINA SOUZA SOUTO**



3. **PROF. DR. MARCELO LANCELOTTI**



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 11 de dezembro de 2012

Às pessoas mais importantes da minha vida: meu pai minha mãe e meu marido.

Epígrafe

A sabedoria superior tolera, a inferior julga; a superior perdoa, a inferior condena. Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar!

Chico Xavier

Agradecimentos

A **Deus**, por me guiar e me proteger sempre.

Aos meus pais **Dú e Jandira** que são indiscutivelmente a razão da minha existência e da minha persistência.

Ao meu amor **Ricardo**, por ter estado ao meu lado nesses últimos anos, dividindo comigo todas as conquistas e os momentos felizes, por confiar em mim e por não me deixar esquecer que tudo vale a pena.

Ao meu sogro **Reginaldo de Paula e a Profa. Dra. Glucia Pastore** pelo incentivo e apoio.

A minha orientadora **Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, por todo o ensinamento, oportunidade e motivação, sem ela não teria tese.

Aos meus filhotes, **Fernando, Mariana, Guilherme, Denise e Juliana** pelo apoio, amizade, companheirismo que tornaram essa fase muito mais amena e feliz.

As amigas **Marília e Alliny** pela ajuda de suma importância nessa tese.

Aos alunos **Ingrid, Gabriela, Paloma, Adriel, Paula e Renata** por toda contribuição.

Ao Dr. **Alessandro**, pela disponibilidade, apoio, incentivo e paciência.

Ao **Prof. Vitor, Helder, Walkyria e Felipe** que sempre estiveram dispostos a ajudar.

As minhas amigas **Ana Ieda e Daniela** pelo apoio e amizade.

Á minha madrinha e amiga **Dirce** pelos ensinamentos, apoio, amizade e lição de vida.

As secretarias **Lúcia, Lais e Adriana** pela atenção e toda ajuda.

Á **Elaine** por todos os ensinamentos e apoio.

Aos funcionários **Marcos, José Raimundo, Marcelo e Sr. Antônio** por todo o auxílio.

Ás agências de fomento **CAPES, CNPq e FAPESP** pelo apoio financeiro.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Abreviaturas

SWCNT – Nanotubos de carbono de parede simples

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

DWCNT- Nanotubos de carbono de paredes duplas

LLC – Carcinoma de pulmão de Lewis

Con A – Concanavalina A

IFN – Interferon

TNF – Fator de necrose tumoral

IL-17 – Interleucina 17

IL-10 – Interleucina 10

TGF – Fator transformador de crescimento

CNTs – Nanotubos de carbono

AFM – Microscopia de força atômica

RNA – Ácido Ribonucleico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

CVD – Método de deposição química

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

TGA – Análise termogravimétrica

MARCO – Receptor de macrófagos com estrutura de colágeno

AC – Alteração de campo

m-RNA – Ácido ribonucleico mensageiro

SI – Sistema imune

NK – Natural Killer

APC's – Células apresentadoras de antígenos

OMS – Organização mundial da saúde

CTLs – Células T citotóxicas

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

Th1 – Linfócitos T helper 1

STAT-4 – Transdutor de sinal

Tregs – Linfócitos T reguladores

nTregs – Linfócitos T reguladores naturais

Foxp3 – Fator de transcrição forkhead Box 3

DCs – Células dendríticas

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS.....	28
CAPÍTULO 1.....	30
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Resumo

A capacidade dos nanotubos de carbono penetrar nas células abriu a possibilidade da utilização dessas nanopartículas no diagnóstico e tratamento das neoplasias malignas. Contudo, pouco se conhece sobre o efeito dessas partículas não funcionalizadas, ou seja, sem moléculas acopladas, sobre a resposta imune. Nesse estudo demonstramos que nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) corados com substância fluorescente penetram nas células de carcinoma de pulmão (LLC) de camundongos. A internalização dessas partículas foi avaliada utilizando-se microscopia confocal e citometria de fluxo. Uma vez dentro das células o MWCNT inibiu a resposta proliferativa das LLC *in vitro*. A inoculação dos nanotubos de carbono *in vivo* também reduziu a velocidade de crescimento do tumor. A redução da velocidade de crescimento foi acompanhada de aumento da resposta proliferativa dos linfócitos estimulados por mitógeno inespecífico e pela expressão de IFN γ . O IFN γ está envolvido na resposta contra os tumores e esses resultados indicam que os nanotubos de carbono estimulam a resposta imune. Por outro lado, verificou-se significativa redução da expressão citocinas como TNF α , IL-17, IL-10 e TGF β , que estão envolvidas na resposta imune pró-tumor.

Esses resultados indicam que, mesmo na ausência de funcionalização, os nanotubos de carbono ativam a resposta imune e que conseqüentemente a resposta imune altera o crescimento desse tumor.

Abstract

The ability of carbon nanotube to penetrate cells opens the possibility for using these particles on diagnosis and treatment of malignant neoplasms. However, little is known about the effect of the non functionalized carbon nanotube, in other words, without attached molecules, on the immune response. In this study, we demonstrate that the multi-walled carbon nanotubos (MWCNT) stained with a fluorescent dye can penetrate mouse lung carcinoma (LLC) cells. These particles internalization was evaluated by confocal microscopy and flow cytometry. Once inside the cells, the MWCNT inhibited the LLC proliferative response *in vitro*. The *in vivo* inoculation of MWCNT in tumor-bearing mice also resulted in the reduction of tumor growth. The growth speed reduction was accompanied by mitogen nonspecific stimulation of T lymphocyte proliferative response and IFN expression. The IFN is involved on response against tumor and these results show that the carbon nanotubes stimulate the immune response. On the other hand, a significant reduction on cytokines like TNF, IL-17, IL-10 e TFG, that are involved on pro-tumoral immune response, was verified. These results show that, even without functionalization, the carbon nanotubos activate the immune response and consequently the immune response changes the tumoral growth.

INTRODUÇÃO

Introdução

A nanotecnologia é um novo campo da ciência voltado para a manipulação de moléculas com medidas nanométricas e tem o objetivo de formar novos produtos e dispositivos que permitam trazer aos produtos já existentes novas funções ou a criação de novas estruturas (1).

Aplicações da nanotecnologia estão presentes em quase todos os aspectos da vida moderna como nos produtos de consumo, produtos químicos, equipamentos médicos e tecnologia de informações. Na área da saúde, a nanotecnologia possui importante papel no desenvolvimento de biosensores (2), nanocosméticos (3) e para aperfeiçoar o efeito de fármacos ou vacinas (4).

Nas últimas décadas uma série de partículas em nano escala foram desenvolvidas para uso terapêutico como as gelatinas, cerâmicas, lipossomos, micelas, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de carbono.

As nanopartículas de carbono emergiram com imenso potencial para o diagnóstico e tratamento de condições patológicas, principalmente no campo da oncologia (1,5,6).

Descobertos por IJIMA, em 1991, os nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*-CNTs) foram assim chamados devido a sua forma tubular e tamanhos nanométrico (7). Os CNTs são estruturas cilíndricas com diâmetro da ordem de poucos nanômetros e comprimento da ordem de microns, sendo constituídos exclusivamente por átomos de carbono dispostos em uma série de anéis benzeno em uma estrutura tubular. Os nanotubos são compostos por folhas de grafite (grafeno) que se enrolam formando uma estrutura oca tubular de forma cilíndrica com 1 átomo de espessura (8,9). Os CNTs podem ser metálicos ou semicondutores e possuem interessantes propriedades óticas, mecânicas e eletrônicas, o que gera pesquisas no intuito de utilizá-los como: sensores químicos e biológicos, pontas para microscópios de força atômica (ATM), emissores de elétrons, armazenadores de gases (por exemplo, o hidrogênio), sistemas carreadores (*delivery system*) que podem carrear fármacos, peptídeos, RNA, DNA), elementos de reforço em

compósitos, *scaffolds* para crescimento de células ósseas e no tratamento de tumores (1,8,9,10).

Os CNTs podem ser classificados em três categorias baseadas na sua estrutura: parede simples (*single wall*, *SWCNT*) que são constituídos de uma camada de grafeno, parede dupla constituído por duas camadas e parede múltipla (*multi wall*, *MWCNT*), constituídos de diversas camadas de grafeno (7,8,11,12). Os SWCNT têm diâmetros entre 0,4 a 3,0 nm e comprimentos na faixa de 20-1000 nm, enquanto MWCNT são maiores, com diâmetros na ordem de 1,4-1000 nm e comprimentos de um a vários micrômetros (13,14).

Em relação à síntese, os CNTs são obtidos a partir de três métodos diferentes, que ocasionam variações tanto no tipo de CNTs gerados (SWCNT, DWCNT ou MWCNT), como no rendimento e no grau de pureza, método por descarga de arco elétrico, ablação por laser e deposição química a partir da fase de vapor (7,15,16).

Esses métodos compartilham uma característica em comum que é a adição de energia a uma fonte de carbono com o intuito de fragmentar essa fonte produzindo átomos de carbono isolados ou fragmentos, que se recombinarão gerando CNTs. A fonte de energia pode ser eletricidade (descarga por arco elétrico), um feixe de laser de alta intensidade (ablação por laser) ou calor de um reator (deposição química por vapor) (16).

O método de descarga por 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 a 3000°C, resultando na deposição de CNTs (formados na presença de catalisadores apropriados – ferro, cobalto ou níquel) sobre um substrato. Esse método é barato, porém apresenta algumas desvantagens como: alta quantidade de impurezas geradas durante o processo de síntese e difícil controle das características dos nanotubos (7,8,16,17,18).

O método por ablação a laser consiste na 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 pela formação de nanotubos de carbono (8,16,17,18). É um método caro e no final do processo aparecem muitas impurezas como partículas de grafite e metais. O método de deposição

química a vapor (CVD) foi descrito em 1993 e 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 dos nanotubos de carbono (19). É o método mais usado para a produção comercial de CNTs, pois diferente dos outros dois métodos citados, a técnica de CVD permite um direcionamento para produção industrial. Também é um método que apresenta maior controle durante sua execução, resultando em CNTs 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 os CNTs, tipo de gás ou solvente utilizado e o tipo de catalisador. Embora os CNTs 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, que limpa os CNTs de impurezas como, resíduos de catalisadores e formas amorfas de carbono (15,20).

Para a caracterização estrutural, morfológica e análise da pureza dos CNTs, várias técnicas são usadas em conjunto complementando umas às outras. Os CNTs 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) e análise elementar de dados. A espectroscopia Raman é considerada a técnica óptica dominante para analisar os CNTs, devido à grande sensibilidade do método e a característica intrínseca dos nanotubos, que emitem um grande sinal Raman (21,22).

Além das características descritas acima, os CNTs possuem interessantes propriedades físico-químicas como: estrutura bem ordenada, baixo peso molecular, alta resistência mecânica, alta condutividade elétrica e térmica e grande área de superfície. A combinação de todos esses fatores faz dos CNTs um material único, com potencial para diversas aplicações (12, 23, 24,25). Nesse contexto surgem vários campos de pesquisa em relação aos CNTs sendo que os principais interesses estão em suas possíveis aplicações em diversas áreas como na Química, Física de materiais, Engenharia, Biologia, Farmacologia e

Medicina (4, 8, 9,26). No entanto, antes que esses CNTs tenham uma aplicação segura na área biomédica, a toxicidade, biocompatibilidade e o desempenho dos mesmos dentro dos sistemas biológicos precisam ser completamente investigados para que o impacto dessas estruturas na saúde seja benéfico (27).

Estudos sobre a utilização dos CNTs em sistemas biológicos foram publicados, embora até hoje não exista consenso sobre a forma na qual os nanotubos atravessam as membranas celulares se são internalizados atingindo o citoplasma e/ou o núcleo (27).

Ainda há debate sobre o mecanismo exato pelo qual os CNTs entram nas células. No entanto, duas vias principais têm sido descritas na literatura: a via de difusão passiva dos CNTs através das bicamadas lipídicas da membrana celular e a via de fixação de CNTs na membrana celular externa, o que resulta na sua absorção pelas células utilizando um processo dependente de energia, tal como a endocitose. O mecanismo exato de absorção de CNTs é determinado por vários fatores, tais como o tamanho, a forma, o grau de dispersão, e a formação de complexos supramoleculares de CNTs (28). O tamanho dos nanotubos de carbono influencia sua absorção celular e destino, SWCNT longos são mostrados no citoplasma, enquanto SWCNT curtos são transportados para o núcleo celular (7).

Ainda, foi demonstrado que os nanotubos utilizam um receptor de macrófago com estrutura colagenosa (MARCO, do inglês, *macrophage receptor with collagenous structure*) presentes na membrana de macrófagos, e posteriormente são fagocitados (29). O receptor MARCO pertence à família de receptores *scavengers* e desempenham um importante papel na fagocitose de partículas ambientais não opsonizadas. Esse mesmo estudo demonstra que os MWCNTS promovem danos nas membranas dos macrófagos após a sua ligação com o receptor MARCO (29).

A aplicação dos CNTs para a entrega de drogas em seu local de ação tornou-se uma das principais áreas de interesse para diferentes grupos de pesquisa. Isto se dá principalmente devido a sua capacidade de associar grupos funcionais desejados em suas camadas exteriores (30). A estrutura monolítica côncava dos CNTs e sua capacidade de ligar grupos funcionais fazem desse material um ótimo transportador de drogas. Eles

podem ser funcionalizados para serem mais solúveis em água e estáveis em soro, com baixa toxicidade celular (30,31).

A maneira de associar moléculas biológicas aos CNTs pode variar, drogas e moléculas biológicas podem se fixar à superfície através de grupos funcionais, em um processo chamado acondicionamento, ou elas podem ser carregadas para o interior dos CNTs (32). Essas funcionalizações são realizadas através de reações químicas nas paredes, pontas dos CNTs, 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 (1, 8, 9,12).

Sem dúvida nenhuma, o maior interesse no emprego das nanopartículas de carbono está voltado para o tratamento do câncer.

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. O câncer ou neoplasia maligna é resultado de mutações em genes específicos, gerando instabilidades genômicas e conseqüentemente proliferação celular acelerada e descontrolada. Tais mutações podem levar à perda ou aumento de função de genes, sendo que alterações tanto genéticas quanto epigenéticas estão envolvidas na oncogênese e progressão tumoral (33,34). Dentre as características peculiares do desenvolvimento de tumores podemos citar: crescimento autossuficiente e ilimitado, resistência à apoptose, resistência aos estímulos de inibição do crescimento, angiogênese sustentada e potencial metastático (35,36).

O arsenal disponível para o tratamento do câncer inclui a resecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia ou a combinação dessas modalidades. Apesar dos progressos observados no tratamento de câncer, a forma convencional de quimioterapia apresenta uma série de problemas como os efeitos colaterais, ou seja, a toxicidade sistêmica e o efeito citotóxico sobre as células saudáveis que circundam os tumores. O risco de nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade vascular, infertilidade e complicações por trombo embolias podem ser antecipados. Outros problemas da quimioterapia convencional incluem a inabilidade de certos quimioterápicos terem acesso às células tumorais.

Diante desses problemas, os pesquisadores trabalham em uma variedade de modelos utilizando nanopartículas, com o intuito de utilizar os quimioterápicos de uma

forma mais eficiente com redução dos efeitos indesejáveis das drogas. Recente estudo demonstrou que SWCNT funcionalizado com drogas antineoplásicas permanecem em circulação por um tempo maior que a droga administrada de forma convencional, o que pode aumentar a eficiência do tratamento. Com relação ao clearance das nanopartículas de carbono, foi demonstrado que os SWCNT funcionalizados com drogas antineoplásicas liberam os fármacos em áreas específicas e são gradativamente removidos da circulação através das vias biliares e intestinais.

A conjugação de CNTs com a droga antineoplásica paclitaxel demonstrou ser eficaz na supressão do crescimento tumoral devido à prolongada circulação sanguínea e, assim, maior captação da droga no tumor. Os CNTs apresentaram biocompatibilidade, excreção eficiente e pouca toxicidade ao organismo (26). Testes *in vivo* da ação dos CNTs conjugados com a droga doxorrubicina, para tratamento de melanoma em camundongos, mostrou que há redução significativa da toxicidade sistêmica do fármaco, mantendo inalterada a sua eficácia terapêutica.

Ainda no campo da oncologia, a exposição à radiação infravermelha leva à morte celular por desnaturação irreversível das proteínas ou dano da membrana plasmática em virtude de temperaturas maiores que 40°C. Esta forma de terapia tem se mostrado eficaz para o tratamento do câncer incluindo o de fígado, pulmão e próstata (37-41).

Os MWCNT parecem ser mais eficientes que os SWCNT para o tratamento dos tumores pela ablação térmica. Isso se deve ao fato dessas estruturas liberarem energia vibracional quando expostas à luz infravermelha. Essas nanopartículas também têm mais elétrons disponíveis por partícula, e também mais metal e tendem a absorver a radiação infravermelha mais rapidamente. A elevação local da temperatura, nesse processo, aumenta a permeabilidade vascular tumoral, o que pode ser vantajoso para a entrega seletiva de medicamentos no local do tumor a partir da circulação sistêmica (42,43).

Além da entrega de drogas (*drug delivery*) anti neoplásicas, os CNTs estão sendo estudados para a entrega de genes específicos na terapia do câncer (44). CNTs parecem representar um vetor não viral muito bom para a terapia gênica, uma vez que podem atravessar a membrana celular por endocitose e, também, devido à funcionalização dos CNTs, o DNA pode ser transferido sem qualquer degradação (45).

Considerando-se que essas nanopartículas são substâncias estranhas ao organismo, é extremamente relevante o estudo da interação dessas nanopartículas e o sistema imunológico do indivíduo.

Em trabalho recentemente publicado, mostramos que mesmo sem funcionalização os MWCNT são capazes estimular tanto a resposta imune inata como adaptativa de animais normais. Após a inoculação com MWCNT foi possível observar significativo aumento da expressão de mRNA de citocinas como TNF α , IL6 e IL10, com concomitante redução do TGF β . Verificamos ainda um significativo aumento da produção de anticorpos específicos para ovalbumina nos animais inoculados com o MWCNT, sugerindo seu efeito na resposta imune adaptativa (46).

A literatura, no entanto, é pobre em estudos relacionando a capacidade dos nanotubos de carbono estimular a resposta imune em indivíduos portadores de tumores.

No início do século XX, Paul Ehrlich sugeriu que o sistema imunológico apresentava habilidade em reconhecer células tumorais como estranhas e reagir contra elas. No entanto, a idéia de que as células tumorais seriam antígenos “não próprios” e que as células do SI teriam a capacidade de reconhecê-las e eliminá-las foi questionado por algum tempo (47,48).

Apesar das controvérsias, um pouco mais tarde, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas reafirmaram a idéia de Ehrlich quando lançaram a teoria da vigilância imunológica, propondo que mesmo quando não detectados, a maioria dos tumores poderiam ser eliminados de forma eficiente pelo sistema imunológico (48,49,50,51).

Vários estudos demonstram que o sistema imune tanto protege o organismo contra o crescimento de tumores, como também induz a resposta do tumor contra o organismo. Essa interação do sistema imune do indivíduo e as diferentes etapas do desenvolvimento dos tumores estão muito bem descritas na hipótese de imunoedição dos tumores. Essa hipótese vem complementar a teoria da vigilância imunológica contra o aparecimento dos tumores no organismo.

A hipótese da imunoedição dos tumores trabalha com a dualidade do organismo em proteger contra as células tumorais utilizando o sistema imune e os mecanismos

imunológicos que também possibilitam o escape do tumor, através supressão ativa do sistema imune (imunossupressão) (35). Esses mecanismos podem ser divididos em três passos principais: (a) *eliminação*, que se refere ao sucesso inicial na erradicação das células tumorais pelo sistema imunológico; (b) *equilíbrio*, em que células tumorais e sistema imune encontram-se em equilíbrio e as células que sobreviveram à eliminação passam a ser remodeladas devido à pressão imunológica, com mutações genéticas variadas que as tornam menos imunogênicas; (c) *escape*, fase final da imunoedição onde as células tumorais variantes menos imunogênicas e conseguem escapar da vigilância imunológica e continuar a sua proliferação (52,53).

Frente a todos estes mecanismos complexos que compõem o SI, observa-se que o combate antitumoral é realizado mais comumente por uma resposta celular mediada principalmente por linfócitos T, tanto CD4+ como CD8+. A literatura mostra que a presença de linfócitos T dentro do tumor (TIL – *tumor infiltrate lymphocytes*) está associada ao melhor prognóstico em diferentes tipos de câncer (54).

Os antígenos tumorais são apresentados via MHC I para os linfócitos TCD8+ que após o reconhecimento do antígeno liberam moléculas de perforinas e granzimas que auxiliam na destruição das células tumorais (55,56). Os linfócitos T CD4+ específicos para os antígenos tumorais orquestram a resposta imune contra os tumores. Esses linfócitos são populações heterogêneas em relação ao tipo de citocinas que eles produzem. Linfócitos CD4 T helper 1 (Th1) produzem interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), potencializando a imunidade mediada por células e são induzidas via sinalização de IL-12 através do transdutor de sinal e ativador de transcrição-4 (STAT-4) e T-bet (57,58,59). Linfócitos CD4 Th2 produzem IL-4, IL-5 e fator transformador de crescimento- β (TGF- β) que direcionam a uma resposta imune do tipo humoral e são induzidas via IL-4 com ativação dos fatores de transcrição 6 (STAT-6) e GATA-3 (57,59).

Na última década o paradigma dos subtipos de linfócitos Th1/Th2 foi questionado. Estudos realizados no modelo da encefalomielite experimental autoimune mostraram a existência de outra população de linfócitos CD4+ que produzem a citocina IL-17 identificada como Th 17, embora outras células possam produzir essa citocina (60). A

IL-17 desempenha um papel importante na regulação da migração leucocitária durante as reações inflamatórias. Deficiência no receptor para IL-17 (IL-17R) diminui a expressão de citocinas e quimiocinas e reduz a infiltração celular, especialmente de neutrófilos (61,62). Embora as células produtoras de IL-17 sejam detectadas em pacientes com câncer e em camundongos portadores de tumores (63), o papel da IL-17 no desenvolvimento do tumor é ainda controverso. Estudos recentes indicam que o crescimento tumoral é aumentado em camundongos geneticamente deficientes (KO) e que o mecanismo está associado com NK produtoras de IFN- γ e linfócitos T (64). Dessa forma, respostas mediadas por IL-17 são protetoras contra o desenvolvimento tumoral. Por outro lado, outro estudo recente mostra que o crescimento tumoral é suprimido em camundongos geneticamente deficientes para IL-17 e IFN- γ (65). O autor sugere que a IL-17 induz a produção de IL-6 pelas células tumorais, a qual, por sua vez, promove o crescimento tumoral por uma via dependente de STAT-3 (60).

Em termos da atuação das células e citocinas no controle da proliferação de células tumorais, a geração eficiente de uma resposta do tipo Th1 parece eficaz na ação antitumoral e o contrário parece ocorrer na indução de Th2 (59,66). O estudo de Bais e colaboradores (2005) demonstrou a mudança para um padrão de citocinas do perfil Th2 durante a carcinogênese em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical grau III (67).

Jie Meng e colaboradores (2010) publicaram um estudo no qual 62 fêmeas de BALB/c tiveram tumor induzido por células Th2 sendo que 44 desses animais foram tratados com MWCNTs e 18 foram utilizados como controles. O estudo relatou um aumento significativo, de mais de 50%, na expressão das citocinas IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-17 nos animais tratados em relação aos controles. Um aumento um pouco menor, mas maior que 20%, foi observado na expressão de TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4 (68).

As células T CD4⁺ também apresentam função imunossupressora e são denominadas células T reguladoras (Tregs). As células Tregs formadas no timo são ditas de ocorrência natural ou células Tregs naturais (nTregs). Expressam as moléculas CD4⁺ e CD25⁺ e o fator de transcrição forkhead box 3 (Foxp3) identificado como fator chave no desenvolvimento de células Tregs. Envolvidas principalmente na manutenção da

autotolerância imunológica, prevenção de doenças autoimunes e de respostas exacerbadas contra patógenos (69,70).

As Tregs também se originam na periferia a partir de determinados estímulos (71). Dentre estas existem as células Th1 e Th3 que realizam suas funções regulatórias através da liberação das citocinas IL10 e TGF- β respectivamente. Estas células, assim como as nTregs, uma vez ativadas, passam a expressar a molécula Foxp3.

Além da atuação na prevenção de autoimunidade e manutenção da autotolerância, há evidências de que as células Tregs atuem a favor da progressão tumoral devido à supressão da resposta imune (72). As células Tregs têm a habilidade de inibir a função efetora de células NK, linfócitos T citotóxicos específicos para o tumor (73,74) e agem ainda sobre DCs inibindo sua função normal (75). No estudo de Wolf e colaboradores, foi possível observar potentes características imunossupressoras como o aumento de células Tregs CD4+ CD25+ no sangue periférico de pacientes com câncer (76).

Embora a resposta imune antitumoral mediada por células seja muito importante, a indução de resposta imune humoral com produção de autoanticorpos contra antígenos super expressos ou modificados no câncer já foi relatada em alguns trabalhos (77,78).

Ainda que não esteja bem conhecido o mecanismo exato para a produção destes autoanticorpos, sabe-se que a maior expressão dos antígenos tumorais durante a carcinogênese são eventos que conduzem maior imunogenicidade tumoral, conseqüentemente estimulando a resposta imune humoral (79,80).

Dependendo do microambiente onde o tumor está em expansão e do tipo de tumor, mesmo citocinas pró-inflamatórias podem exercer atividade pró ou antitumoral. O TNF α , por exemplo, apresenta atividade pró e antitumoral. A ação do TNF α nas células em um microambiente tumoral promove angiogênese, e diminuição da vigilância imunológica através da supressão da resposta proliferativa de linfócitos T e inibição da citotoxicidade mediada pelos macrófagos. Por outro lado, essa mesma citocina está envolvida na resposta contra os tumores.

Embora seja uma citocina, com efeito antiinflamatório, a IL-10 também apresenta função de suprimir e estimular o crescimento de tumores. A IL-10 tem a propriedade de inibir a angiogênese dos tumores, assim como aumentar a produção de moléculas tóxicas como o óxido nítrico, o que leva a regressão dos tumores em alguns modelos experimentais. Por outro lado, a IL-10 diminui a apresentação cruzada dos antígenos tumorais nas células dendríticas, e isso inibe a ativação de linfócitos específicos para os tumores e conseqüentemente prejudica a resposta imune antitumoral.

O tumor ainda induz disfunção imune através da secreção de TGF β , essa citocina induz células mieloides supressivas e células Tregs. Além disso, os tumores podem ainda conduzir à supressão das funções das células dendríticas (CDs), tornando-as incapazes de estimular e ativar de forma eficiente as células T. Observa-se que esta imunossupressão das CDs ocorre de forma sistêmica e alterações na sua diferenciação são freqüentemente evidenciadas, com diminuição de CDs maduras, funcionais e aumento de CDs imaturas e funcionalmente incapazes de ativar as células T (81).

A literatura é pobre no que diz respeito ao estudo da resposta imune de animais portadores de tumores na presença de nanopartículas de carbono. No entanto, alguns trabalhos mostram essa interação. Um estudo publicado por Kateb e colaboradores (2007) mostrou que a internalização de MWCNT por macrófagos e células tumorais não altera o perfil de expressão de citocinas nem a capacidade de proliferação dessas células. Nesse mesmo estudo foi avaliada a capacidade dos CNTs em ligar-se ao DNA e carregá-los para dentro de células da microglia (28).

Diante da importância do sistema imune no controle das neoplasias e o crescente interesse da comunidade científica em utilizar os nanotubos de carbono como alternativa terapêutica para os tumores, no presente estudo verificamos como a inoculação dos MWCNT altera a resposta imune e conseqüentemente o crescimento do carcinoma de pulmão de Lewis (LLC). O LLC foi isolado a partir de um carcinoma epidermóide espontâneo de camundongo C57BL/6. Trata-se de um tumor transplantável, pouco hemorrágico e a maior parte do tecido tumoral é uma massa homogênea e semiuniforme, sendo, portanto, um modelo tumoral importante para diferentes estudos (82).

OBJETIVOS

Objetivos

Estudar o efeito da administração dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas na resposta imunológica e no desenvolvimento do carcinoma de pulmão induzido em camundongos.

CAPÍTULO 1

In vivo administration of multi walled carbon nanotubes (MWCNT) reduces the growth of lung carcinoma in mice by activating the immune response

***In vivo* administration of multi walled carbon nanotubes (MWCNT) reduces the growth of lung carcinoma in mice by activating the immune response**

Rosemeire F.O. Paula^a, Fernando Pradella^a, Ana Leda F. Longhini^a, Elaine C. Oliveira^{a,c}, Mariana P. A. Santos^a, Adriel S. Moraes^a, Guilherme A. D. Morais^a, Marília D. Andrade^a, Alliny C. Dionete^a, Daniela S. Camilo^{a,b}, Walkyria M. Volpini^a, Alfredo Peterlevitz^b, Helder Ceragioli^b, Vitor Baranauskas^b, Alessandro S. Farias^a and Leonilda M.B. Santos^a.

^a Laboratório de Neuroimunologia, Dept. Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia

^b Laboratório de Fotônica Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação (2), Universidade de Campinas – Campinas - SP – Brazil.

^c Centro Paula Souza , Sorocaba, SP, Brazil

Running title: carbon nanotubes reduce the growth of tumors

Key words: carbon nanotubes, Lewis lung carcinoma, immune response

Abstract word count: 148 words

Manuscript word count: 4308 words

Number of references: 41 references

Number of figures: 4 figures

Financial Support: We wish to express our sincere thanks to the Brazilian agencies FAPESP, CNPq and CAPES (REDE NANOBIOTEC, 2008) for their financial support.

Address for correspondence: Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Genética,

Evolução e Bioagentes – Instituto de Biologia - Rua Monteiro Lobato, 255 - Campinas - SP

- Brasil - CEP 13083-862 – UNICAMP - Campinas – SP – Brazil

Phone: 55.19.35216262; FAX: 55.19.35216276; Email: leonilda@unicamp.br

Abstract

The ability of carbon nanotube to penetrate cells opens the possibility for using these particles to improve the diagnosis, monitoring and treatment of cancers. However, little is known about the effect of the carbon nanotube without functionalization on the host immune response. Here, we demonstrate that the MWCNT stained with a red fluorescent dye can penetrate Lewis lung Carcinoma (LLC) cells. The *in vivo* inoculation of MWCNTS in tumor-bearing mice results in the reduction of tumor growth. The reduction of the tumor growth is accompanied by stimulation of T lymphocyte proliferative response and *in vitro* suppression of LLC cells proliferation. Moreover, an increase in the expression of IFN γ was observed with a simultaneous significant decrease of other cytokines such as TNF α , IL-17, IL-10 and TGF β . These results suggest that even without functionalization the growth of tumor cells are inhibited by MWCNT due to stimulation of host immune response.

Introduction

Carbon nanotubes have generated much interest as possible biological vectors after the discovery of their capacity to penetrate cells. This property is currently used to improve the diagnosis, monitoring, and treatment of many diseases, including cancer.¹⁻³ However, the host immune response against the carbon nanotubes should be considered prior to any treatment. Recently, we have demonstrated that the *in vivo* administration of non-functionalized carbon nanotubes stimulates both the innate and adaptive immune response.⁴

Recent studies demonstrated that the immune system not only protects the host against tumor growth but also induces tumor immunogenicity, which is the basis of cancer immunoediting hypothesis. This hypothesis stresses the dual host-protective and tumor-promoting actions of immune system in the development of tumors⁵. Tumor-specific CD4⁺ T lymphocytes orchestrate the immune response against cancer. CD4⁺ T lymphocytes are required for cytokine-mediated activation of tumor-specific cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes. Tumor infiltration by IFN γ producing Th1 CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes and the presence of cytokines such as IFN γ and TNF α that promote tumor control has been associated with an improved prognosis for patients with many different cancers.⁶⁻¹¹ On the other hand, CD4⁺ T cells may also suppress antitumor immunity through the activation of CD4⁺CD25⁺ T cells or IL-10-producing type 1 T regulatory (Tr1) cells, which down regulate the immune system.¹²⁻¹⁴ In mice bearing tumors the production of immune suppressive cytokines, such as IL-10 and TGF β , is accelerated and the high infiltration of T regulatory cells was demonstrated in tumor microenvironment.¹⁵⁻¹⁶

In the current study, we present evidence that the *in vivo* administration of non-functionalized carbon nanotubes reduces the growth of Lewis lung carcinoma (LLC) cells either *in vivo* or *in vitro*. The reduction of the tumor growth was accompanied by the increase in proliferative response of T lymphocytes and of the IFN γ expression. In parallel, significant decreases of TNF- α , IL-10 and TGF- β were observed after inoculating MWCNTS in tumor-bearing mice. These findings support the idea that even without previous functionalization, the MWCNTS plays an important role against tumor growth due to their capacity of stimulate the host immune system.

Methods

Preparation and characterization of carbon nanotubes

The MWCNTS used in this research were prepared in our laboratory.¹⁷ The procedure involved HFCVD of carbon atoms from carbon sources on polished copper foil substrate (10 x 10 mm square) of 0.5 mm thickness. Before the MWCNTS deposition, the substrates were coated with a polyaniline solution without spinning and dried on a hot-plate in air of 373 K for 120 min, they were then wet with 0.2 ml of acetone doped with nickel nitrate (2 g l⁻¹). The substrates were immersed for 30 min in the reaction chamber of the HFCVD system and fed with the vapor of camphor diluted in propanone (2 g l⁻¹). Two different carrier gases were used in the reactor chamber: hydrogen (14.5% Vol.) and nitrogen (85% Vol.). A total pressure of about 27 mbar and a total flow rate of about 100 sccm were maintained throughout preparation. The temperature, measured by a thermocouple placed on the underside of the copper substrate, was maintained at 723 K. During the HFCVD processing, felts of MWCNTS were formed over the top surface of the substrate. These felts were easily detached at the end of the process, due to the MWCNTS/copper thermal dilatation coefficient mismatch. The felts were finally ultrasound treated for 20 min leading to the production of a powder of MWCNTs of around 1000 nm in length and 20 nm in diameter, open at both ends.

Raman spectra were recorded at room temperature using a Renishaw microprobe system employing an Argon laser for excitation ($\lambda = 514.5$ nm), with a laser power of about 6 mW. Morphological analyses of the samples were made with a FESEM using a JEOL JSM-6330F operated at 5 kV and 8 μ A and with a HRTEM using a JEOL 3010.

Animals

C57Bl/6 mice were originally obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine-USA) and are currently established as a colony at the University of Campinas Breeding Center, where they are housed and maintained pathogen free. Six to eight-week-old females were used in the experiments. They were allowed access to

standard rodent chow and water *ad libitum*, with the temperature maintained between 21°C and 23°C in a 12h light /12h dark cycle. The animals were age matched for individual experiments and randomly distributed to treatment and control groups. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care and approved by the University Committee for Ethical Animal Experimentation (CEEA/UNICAMP # 2038-1).

MWCNTS preparation for *in vitro* and *ex vivo* assays

For *in vitro* assay, the sonicated MWCNTS were heat-treated at 250°C for 2h in an electric furnace to remove possible contaminating endotoxins. After sterilization, the MWCNTS (1 mg) were suspended in 10% endotoxin-free Pluronic 68 (F 68) (Sigma, St. Louis, MO, USA), since pluronic surfactant reduces the hydrophobic interactions and improves the solubility of the nanotubes preparations.¹⁸ The suspension containing MWCNTS was added to the cultures (1 µg/ml) so that the final Pluronic F 68 concentration was 0.1%.

For *in vivo* assays, the sonicated and sterilized MWCNTS were suspended in sterile phosphate-buffered saline with Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ (PBS) at a concentration of 100 µg/mouse and they were continuously vortexed until intravenously inoculation through the orbital plexus.

Mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells were obtained from Dr Giselle Longo. After defrosting, cells were seeded at 2-3.10⁶ cells/100 mm dish and cultivated with complete culture medium (added 0,5% piruvate, 1% MEM [MEM non essential Amino Acids, Invitrogen, USA), under 37° C and 5% CO₂ tension, for 24 hours. The medium was replaced every 48 hours, and the cells were harvested after 144 hours of incubation. A total of 10⁶ LLC cells were injected subcutaneously in the right flank of C57BL/6 mice. When tumors reached 5 mm in diameter (day 10), the mice were randomized to treatment groups of 10 mice.

Twenty four hours later, five mice from each group were sacrificed for histological examination and toxicity study. The remaining mice were examined every 3 days for evaluation of tumor growth. Tumor sizes were measured using a caliper in mm³

and volumes were calculated using the following formula: $TV \text{ (mm}^3\text{)} = (\text{width}^2 \times \text{length})/2$, where L equals length and W equals width. Study endpoint was death or sacrifice of the animal with very high tumor volume that exceeded 3500 mm³.

MWCNTS labeling

The sonicated MWCNTS were tagged with a non-toxic, hydrophobic red fluorescent dye (PKH26; Sigma Aldrich, MO, USA). The PKH26 stock solution was diluted to 2×10^{-6} M and added to the MWCNTS stock for incubation at room temperature for 5 min. The stained nanotubes were then washed three times with PBS, centrifuged at 120,000xg for 4 h at 4°C, suspended to 80 µg/ml using 0.1% F 68. This preparation of MWCNTS was used within 24 h of labeling.

Confocal Microscopy

A Zeiss LSM 510 Meta inverted 2-photon confocal microscope was used for fluorescent imaging study. Cells were plated in 33 mm dishes in 2 ml culture medium. An Argon 488 nm laser was used to excite the PKH26 dye.

Flow Cytometry

Flow cytometry was performed to detect stained MWCNTS within tumor cells. The LLC cells were incubated with MWCNTS (10 µg/ml) for 4 h at 37°C. After the period of incubation the cells were washed twice and analyzed by a flow cytometer. Data was acquired (10,000 to 30,000 cells) on a FACSCanto cytometer (BD Biosciences, USA) and analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences, USA).

Lymphocyte proliferative response

The evaluation of the proliferative response of lymphocytes to a nonspecific mitogen was performed in lymph node cells. The lymph node cells were removed at 7 days after administration of the MWCNTS. The lymph nodes were mechanically dispersed through a nylon mesh to isolate single-cell suspensions. The cells in suspension were

washed twice in Hanks solution and re-suspended in a culture medium (RPMI-1640) with β Mercaptoethanol, antibiotics, and 5% heat-inactivated fetal bovine serum and stimulated with Concanavalin-A (Con-A) for 72 h. Cultured cells were pulsed with tritiated Thymidine (1 μ Ci/ml) and the DNA-incorporated radioactivity, reflecting active cell proliferation, was measured 18 h later using standard liquid scintillation techniques ⁴. The results were expressed in counts per minute (CPM), considering the triplicate averages.

Quantitative RT- PCR

The mRNA of the spleen cells was extracted by using Trizol (Applied bioscience, USA) according to the manufactures recommendations, and reversed to cDNA. Taqman analysis was performed with an ABI Prism 7500 Taqman Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The primers GAPDH, IFN γ , TNF α , IL-17, IL-10, and TGF β were obtained from the approved list of applied bioscience manufacturers. The expression of a housekeeping gene (GAPDH) was set in relation to the specific mRNA. Data was obtained by independent duplicate measurements (six mice/group). The threshold cycle value of the individual measurements did not exceed 0.5 amplification cycles.

Statistical analysis

The statistical significance of the results was determined using a Kruskal-Wallis non- parametric analysis of variance or a Mann-Whitney U test. A *p* value smaller than 0.05 was considered significant.

Results

Raman and FESEM and HRTEM morphological characterization of carbon nanoparticles

Figure 1A shows a typical Raman spectrum of the as-deposited samples. This spectrum can be divided into regions of first- and second-order frequencies. In the first-order region, two intense peaks appear at 1344 and 1578 cm^{-1} , corresponding to the Disorder-induced sp^2 peak (D-line) and the Graphite-oriented E_{2g} mode sp^2 peak (G-line). In the second-order region, there is a high peak at 2687 cm^{-1} , which corresponds to the second harmonic of the D-line (2 x D), a small peak around 2921 cm^{-1} corresponding to the sum of the D- and G-line frequencies (D + G), and a small peak around 3202 cm^{-1} corresponding to the second harmonic of the G-line (2 x G). The intensity of the D-peak was greater than that of the corresponding G-peak, which does not indicate a high degree of C-C sp^2 order, corresponding to the Raman spectrum for disordered multi-walled carbon nanotubes. Figures 1B-C present a typical HRTEM image showing the nature of MWCNTS structure.

Internalization of MWCNTS by LLC cells

To investigate whether the MWCNTS penetrates into the LLC cells, these cells were cultured in the presence of MWCNTS (10 $\mu\text{g/ml}$) labeled with fluorescent dye. After 24 h, the cells were examined under confocal microscopy and by flow cytometry. Figure 2 clearly demonstrates that tumor cells internalized the MWCNTS. The internalization was evaluated either by flow cytometry or confocal microscopy. Figure 2A demonstrates the results of unstained LLC cells, while figure 2B demonstrates the results of LLC stained with the fluorescent dye. Figure 2C demonstrates the negative control of the analysis of the LLC cells stained with fluorescent dye, while the figure 2D shows the LLC cells with stained carbon nanotubes in the cytoplasm. To investigate whether the internalization of carbon nanotubes interferes in the growth of LLC, these cells were label with 3H thymidine. Figure 2E demonstrates that the internalization of carbon nanoparticle significantly reduces the proliferative response of tumor cells.

MWCNTS administered systemically reduce the growth of lung carcinoma

Since the internalization of MWCNTS reduces the *in vitro* growth of LLC, we investigated whether these nanoparticles interfere in the *in vivo* growth of the carcinoma. The carbon nanoparticles were inoculated systemically (100 µg/mouse). The growth of the carcinoma was followed and the tumor mass was measured every other day. Figure 3 clearly demonstrates that the administration of MWCNTS significantly reduces the growth of the carcinoma in relation to untreated mice.

MWCNTS stimulate immune response in mice

The observation that the systemic administration of MWCNTS results in the reduction of the tumor mass suggests that the nanoparticles may directly inhibit the growth of tumor cells or that the inhibition of growth might be explained by activation of mice immune response. To test the second hypothesis, the proliferative response of T lymphocytes and the expression of cytokines from mice inoculated or not with MWCNTS were evaluated. Figure 4A demonstrates that the *in vivo* administration of MWCNTS stimulated the proliferative response of T lymphocytes from mice inoculated with carbon nanoparticles systemically in relation to the control group. The activation of T lymphocytes was accompanied by increase of expression of IFN γ (Figure 4B) and a significant decrease of IL-17, suggesting that the nanoparticles selectively suppress the Th17 cells. Significant decrease in the expression of TNF α , IL-10 and TGF β was also observed. These results suggested that the beneficial effects of carbon nanotubes might be explained, at least in part, by the modulation of cytokines production.

Discussion

Carbon nanotubes have emerged as candidates for a novel chemotherapeutic drug deliver.^{19,20} However, the effect of these nanoparticles on host immune system before functionalization with antitumoral drugs needs additional study. In the present study, we were able to demonstrate that the *in vivo* administration of MWCNTS significantly reduced the growth of lung carcinoma in mice and we present evidence that the beneficial effect of these nanoparticles is due the activation of the immune system of tumor-bearing mice.

To investigate whether the LLC cells internalized the MWCNTS, the cells were incubated with MWCNTS previously stained with a fluorescent dye. The results clearly demonstrated that the LLC cells internalized the MWCNTS without apparent cytotoxicity. The internalization of carbon nanotubes results in significant inhibition of *in vitro* growth of LLC cells. Significant reduction of the velocity of tumor growth was also observed when MWCNTS were administered systemically in tumor-bearing mice. The systemic form of administration is relevant because it allows the nanotubes to reach many types of tumors.

To investigate whether the administration of MWCNTS stimulates the immune response, the proliferative response of T lymphocytes of tumor-bearing mice and of those treated with carbon nanotubes was evaluated. We demonstrated that tumor-bearing mice presented a significant reduction of proliferative response of T lymphocytes in relation to normal mice, which indicates that these individuals presented immunosuppression. Interestingly, the administration of MWCNTS reversed the inhibition of proliferative response of T lymphocytes, emphasizing that the inoculation of MWCNTS stimulate the immune response.

Activated T lymphocytes produce cytokines, which are involved in both promoting tumor growth and in the immunity against the tumors. This complex cytokine network influences the malignant cell proliferation, metastasis, angiogenesis and the composition of the leukocytes either in the tumor microenvironment or the peripheral lymphoid organs. In the present study, the mRNA expression of cytokines was evaluated in lymph nodes of tumor-bearing mice inoculated or not with the MWCNTS. Activated CD4⁺ T lymphocytes secrete specific cytokines that can regulate effector immune responses.

Three major CD4⁺ T lymphocytes subsets have been described: Th1 cells that produce IFN γ ; Th2 cells, characterized by secretion of IL-4, IL-5, and IL-13; and Th17 cells that secrete IL-17A and IL-17E.²¹⁻²² The IFN γ act as an extrinsic suppressor of tumor evolution. This cytokine acts by inhibiting tumor incidence and growth.²³⁻²⁴ Here, we demonstrated that the inoculation of MWCNTS stimulated the expression of IFN γ , which may explain, at least in part, its contribution to the reduction of tumor growth in tumor-bearing mice.

The function of CD4⁺ T helper 17, which secrete IL-17 in tumor immunity is still controversial. Previous studies demonstrated that IL-17-producing cells are detected in cancer patients and tumor-bearing mice.²⁵⁻²⁸ Moreover, recent studies have proven that IL-17 promotes tumor development by inhibiting the CD8⁺ T cell infiltration in tumors by the enhancement of myeloid-derived suppressor cells development and function.²⁹ Here we demonstrated that tumor-bearing mice presented increased expression of IL-17, which is significantly decreased after inoculation with MWCNTS. This result suggests that decreased expression of this cytokine may be beneficial to tumor-bearing mice.

It is noteworthy that carbon nanoparticles act differently on the Th1 and Th17 subsets of CD4⁺ T lymphocytes. Although this observation needs further investigation, this apparent discrepancy may be explained by the effect of the MWCNTS on the intracellular pathway of these subsets of CD4⁺ T lymphocytes. Th1 lymphocytes express a T-bet transcription factor, which is required for IFN γ differentiation; while Th17 expresses the ROR γ t essential for its differentiation.³⁰ These results suggest that inoculation of MWCNTS stimulate selectively the Th1 subset of CD4⁺ T lymphocytes.

The administration of MWCNTS to tumor bearing mice also showed a significant decrease of TNF α in relation to tumor-bearing mice untreated. The TNF α has both tumor-promoting and antitumor activities. The action of TNF α on cells in the tumor microenvironment includes promotion of angiogenesis,³¹ impairment of immune surveillance through T cell suppression and inhibiting the cytotoxicity of activated macrophages.³² Recent study has demonstrated that TNF α also promotes Th17 cells differentiation.³³ These results suggest that the beneficial effect of MWCNTS is associated with the decrease of these proinflammatory cytokines.

We have observed that the administration of MWCNTS induced a significant decrease in production of IL-10 in tumor-bearing mice. IL-10, a potent pleiotropic cytokine, has the dual ability to immunosuppress or immunostimulate anti-cancer properties.³⁴ IL-10 can inhibit tumor-induced angiogenesis and enhance the production of tumor-toxic molecules such as nitric oxide, which leads to tumor regression in some preclinical models.³⁵⁻³⁶ On the other hand, IL-10 can impair tumor-associated antigen cross-presentation by dendritic cells, thus potentially preventing T cells from mounting an effective immune response against malignant cells.³⁷ Thus, the effect of carbon nanotubes decreasing IL-10 expression may contribute to the activation of immune response in tumor-bearing mice.

Many tumors are already known to evade immune surveillance by impairing the development or activity of tumor-specific cytotoxic T cells, in a TGF β -dependent manner.³⁸⁻⁴⁰ A previous report has demonstrated that TGF β subverts the immune systems into directly promoting tumor growth through IL-17 production.⁴¹ Here, in agreement with these observations, we have shown that lymph nodes from tumor-bearing mice express a significant increase of TGF β , which is significantly decreased after inoculation of MWCNTS. Thus, the beneficial effect of carbon nanoparticle may be explained by its action in this cascade of cytokines.

Taken together, we were able to demonstrate that carbon nanoparticles increase the expression of IFN γ with simultaneous decrease of IL-1, TNF α , IL-10 and TGF β in tumor-bearing mice. These results suggested the effect of the carbon nanoparticle on immune system should be considered before drug-deliver experiments. Moreover, the possibility to combine the proinflammatory properties of MWCNTS with the functionalization of certain chemotherapeutic drugs will permit further exploration relating to chemo and immunotherapy to obtain significant improvement in response against tumors.

References

1. S. Y. Madani, A. Tan, M. Dwek and A. M. Seifalian, *Int J Nanomedicine* 7, 905-914 (2012).
2. S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan and A. M. Seifalian, *Int J Nanomedicine* 6, 2963-2979 (2011).
3. A. M. Elhissi, W. Ahmed, I. U. Hassan, V. R. Dhanak and A. D'Emanuele, *J Drug Deliv* 2012, 837327 (2012).
4. A. C. Grecco, R. F. Paula, E. Mizutani, J. C. Sartorelli, A. M. Milani, A. L. Longhini, E. C. Oliveira, F. Pradella, V. D. Silva, A. S. Moraes, A. C. Peterlevitz, A. S. Farias, H. J. Ceragioli, L. M. Santos and V. Baranauskas, *Nanotechnology* 22 (26), 265103 (2011).
5. R. D. Schreiber, L. J. Old and M. J. Smyth, *Science* 331 (6024), 1565-1570 (2011).
6. V. Shankaran, H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber, *Nature* 410 (6832), 1107-1111 (2001).
7. K. M. Friedman, P. A. Prieto, L. E. Devillier, C. A. Gross, J. C. Yang, J. R. Wunderlich, S. A. Rosenberg and M. E. Dudley, *J Immunother* 35 (5), 400-408 (2012).
8. L. Zhang, J. R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P. A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M. N. Liebman, S. C. Rubin and G. Coukos, *N Engl J Med* 348 (3), 203-213 (2003).
9. M. Camus, M. Tosolini, B. Mlecnik, F. Pages, A. Kirilovsky, A. Berger, A. Costes, G. Bindea, P. Charoentong, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and J. Galon, *Cancer Res* 69 (6), 2685-2693 (2009).
10. H. E. Kohrt, N. Nouri, K. Nowels, D. Johnson, S. Holmes and P. P. Lee, *PLoS Med* 2 (9), e284 (2005).
11. G. Rahir and M. Moser, *Cancer Immunol Immunother* 61 (6), 751-759 (2012).
12. A. Facciabene, S. Santoro and G. Coukos, *Oncoimmunology* 1 (4), 575-577 (2012).
13. K. L. Knutson, M. L. Disis and L. G. Salazar, *Cancer Immunol Immunother* 56 (3), 271-285 (2007).

14. W. Tan, W. Zhang, A. Strasner, S. Grivennikov, J. Q. Cheng, R. M. Hoffman and M. Karin, *Nature* 470 (7335), 548-553 (2011).
15. B. Bierie and H. L. Moses, *Cytokine Growth Factor Rev* 21 (1), 49-59 (2010).
16. H. Bohlen, M. Kessler, M. Sextro, V. Diehl and H. Tesch, *Ann Hematol* 79 (3), 110-113 (2000).
17. H. J. Ceragioli, A. C. Peterlevitz, J. C. R. Quispe, A. Larena, M. P. Paschetto, M. A. Sampaio and V. Baranauskas, *J Phys Conf Ser* 100 (2008).
18. M. D. Clark, S. Subramanian and R. Krishnamoorti, *J Colloid Interface Sci* 354 (1), 144-151 (2011).
19. S. Kolhe and K. Parikh, *Int J Bioinform Res Appl* 8 (1-2), 112-125 (2012).
20. C. Fabbro, H. Ali-Boucetta, T. Da Ros, K. Kostarelos, A. Bianco and M. Prato, *Chem Commun (Camb)* 48 (33), 3911-3926 (2012).
21. C. Pot, L. Apetoh, A. Awasthi and V. K. Kuchroo, *Semin Immunol* 23 (6), 438-445 (2011).
22. A. Jager, V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli and V. K. Kuchroo, *J Immunol* 183 (11), 7169-7177 (2009).
23. G. P. Dunn, C. M. Koebel and R. D. Schreiber, *Nat Rev Immunol* 6 (11), 836-848 (2006).
24. H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber, *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (2), 95-109 (2002).
25. X. Y. Meng, C. H. Zhou, J. Ma, C. Jiang and P. Ji, *Med Oncol* (2012).
26. M. Paladugu, A. Thakur, L. G. Lum, S. Mittal and P. Parajuli, *Cancer Immunol Immunother* (2012).
27. I. Kryczek, S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan and W. Zou, *Blood* 114 (2), 357-359 (2009).
28. D. He, H. Li, N. Yusuf, C. A. Elmets, M. Athar, S. K. Katiyar and H. Xu, *PLoS ONE* 7 (2), e32126 (2012).
29. D. He, H. Li, N. Yusuf, C. A. Elmets, J. Li, J. D. Mountz and H. Xu, *J Immunol* 184 (5), 2281-2288 (2010).
30. V. Lazarevic, X. Chen, J. H. Shim, E. S. Hwang, E. Jang, A. N. Bolm, M. Oukka, V. K. Kuchroo and L. H. Glimcher, *Nat Immunol* 12 (1), 96-104 (2011).

31. S. J. Leibovich, P. J. Polverini, H. M. Shepard, D. M. Wiseman, V. Shively and N. Nuseir, *Nature* 329 (6140), 630-632 (1987).
32. N. B. Hao, M. H. Lu, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang and S. M. Yang, *Clin Dev Immunol* 2012, 948098 (2012).
33. L. C. Zaba, I. Cardinale, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, M. Suarez-Farinas, J. Fuentes-Duculan, I. Novitskaya, A. Khatcherian, M. J. Bluth, M. A. Lowes and J. G. Krueger, *J Exp Med* 204 (13), 3183-3194 (2007).
34. S. Mocellin, F. M. Marincola and H. A. Young, *Journal Leukocyte Biol* 78 (5), 1043-1051 (2005).
35. K. Asadullah, W. Sterry and H. D. Volk, *Pharmacol Rev* 55 (2), 241-269 (2003).
36. L. Cervenak, L. Morbidelli, D. Donati, S. Donnini, T. Kambayashi, J. L. Wilson, H. Axelson, E. Castanos-Velez, H. G. Ljunggren, R. D. Malefyt, H. J. Granger, M. Ziche and M. T. Bejarano, *Blood* 96 (7), 2568-2573 (2000).
37. K. Avradopoulos, S. Mehta, D. Blackinton and H. J. Wanebo, *Ann Surg Oncol* 4 (2), 184-190 (1997).
38. L. Yang and D. P. Carbone, *Adv Cancer Res* 92, 13-27 (2004).
39. H. Gobbi, W. D. Dupont, J. F. Simpson, W. D. Plummer, Jr., P. A. Schuyler, S. J. Olson, C. L. Arteaga and D. L. Page, *J Natl Cancer Inst* 91 (24), 2096-2101 (1999).
40. H. G. Kang, M. H. Chae, J. M. Park, E. J. Kim, J. H. Park, S. Kam, S. I. Cha, C. H. Kim, R. W. Park, S. H. Park, Y. L. Kim, I. S. Kim, T. H. Jung and J. Y. Park, *Lung Cancer* 52 (1), 1-7 (2006).
41. R. Schnepf and X. Hua, *Cancer Biol Ther* 2 (2), 171-172 (2003).

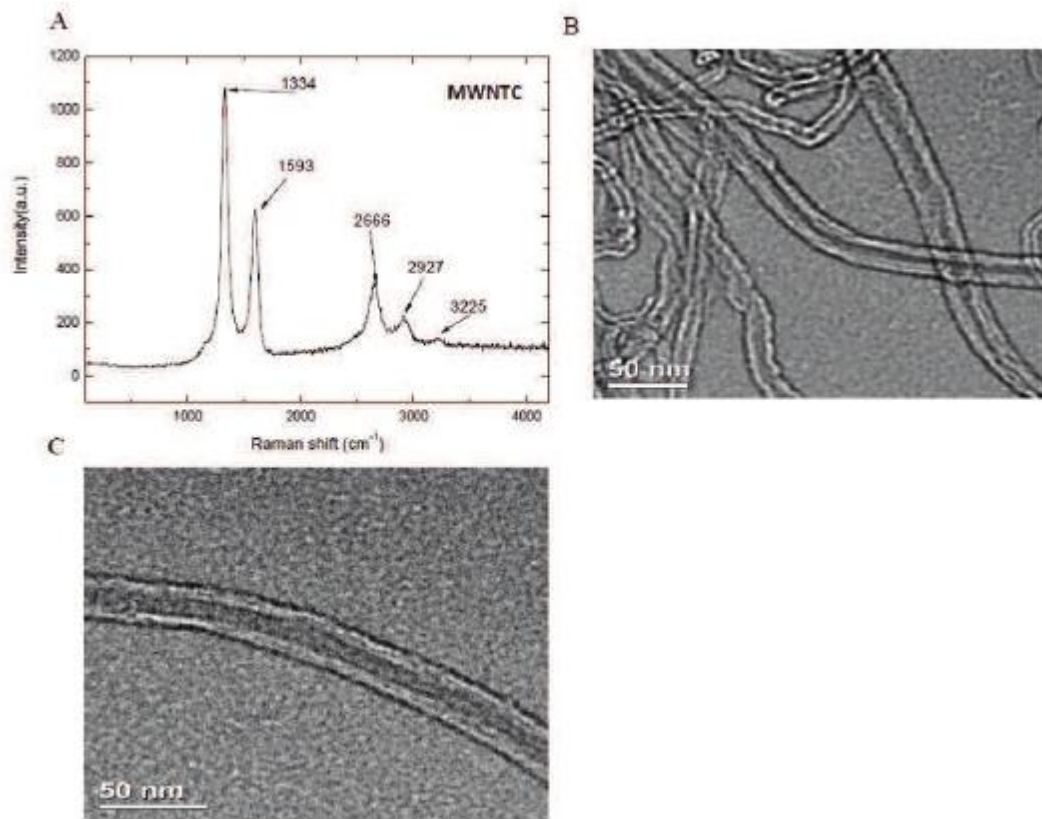


Figure 1 - Typical Raman spectrum of the as-deposited MWCNTS preparation (A). HRTEM (B) and (C) showing the nature of the MWCNTS structure.

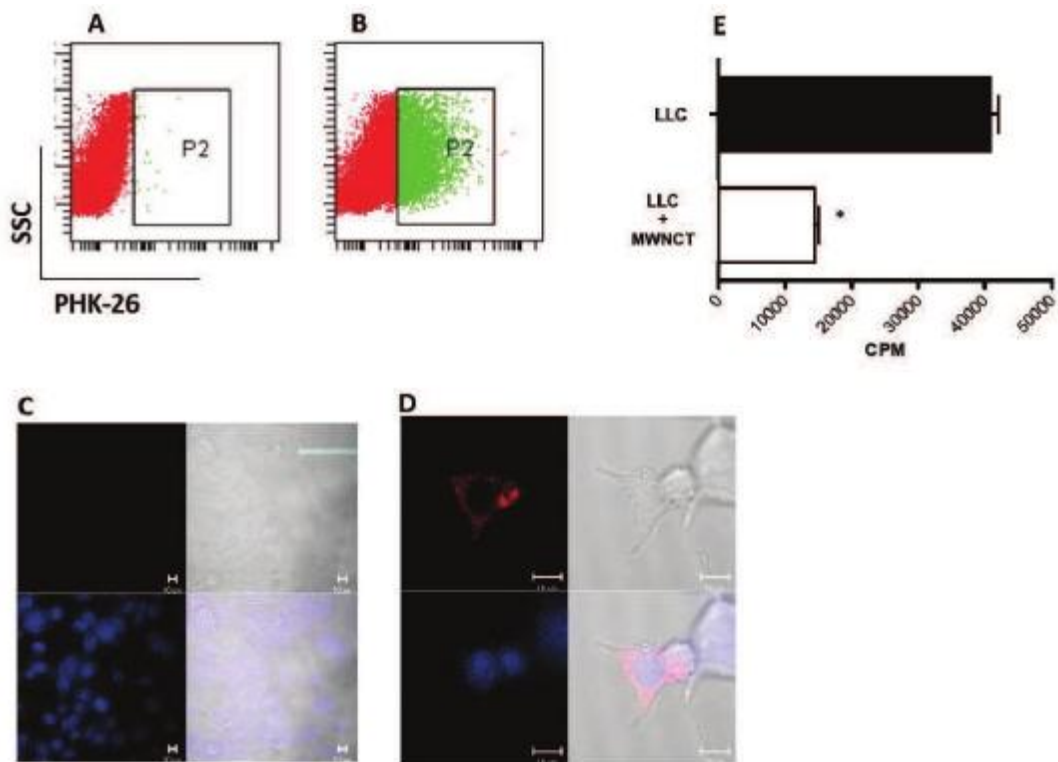


Figure 2 – Internalization of MWCNTS by LLC. Flow cytometry of unlabeled (A) and PHK-26-labeled MWCNTS incubated with LLC (B). C) Confocal image of LLC cells without MWCNTS and PHK-26-labeled MWCNTS (D). Proliferation of LLC cells incubated and not-incubated with MWNCT (E).

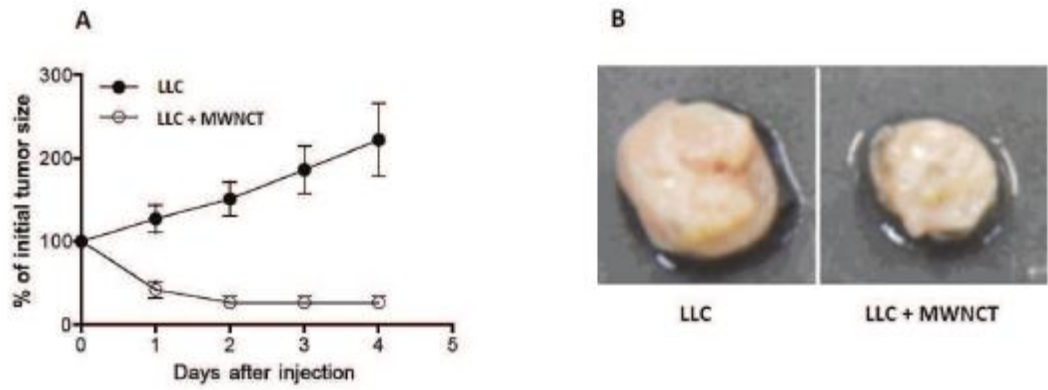


Figure 3 – A) Evolution of tumor size, in relation to the initial tumor size, after injection. B) Representative tumor image of LCC and LCC+MWCNTS groups.

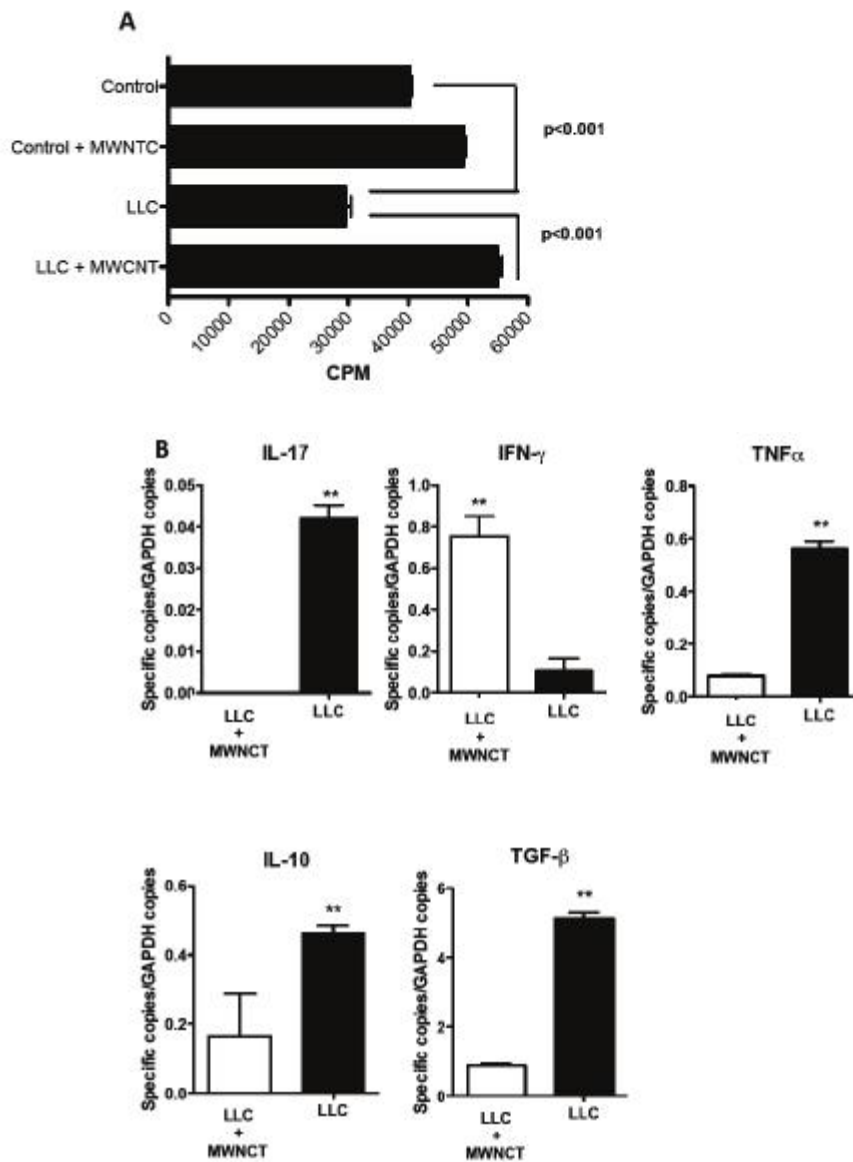


Figure 4 - Lymph proliferative response of lymph nodes from naïve control and tumor-bearing animals injected and not with MWCNTS (A). Expression of cytokines (IL-17, IFN γ , TNF α , IL-10 and TGF β) in the lymph nodes of LLC and LLC+MWCNTS injected animals (B).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ Os nanotubos de carbono são internalizados pelas LLC.
- ✓ Os MWCNTS reduzem, significativamente, o crescimento das LLC *in vitro*.
- ✓ A administração sistêmica de MWCNT reduz significativamente o crescimento do carcinoma de pulmão experimental.
- ✓ A inoculação com as nanopartículas de carbono estimula a resposta proliferativa de linfócitos T com mitógeno inespecífico e aumenta a expressão dos IFN- γ .
- ✓ A administração *in vivo* dos MWCNTS reduz a expressão das citocinas IL-1, TNF- α , IL-10 e TGF- β .

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIA

1. Patlolla A, Patlolla B, Tchounwou P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. *Molecular Chemistry and Biochemistry*. 2010; 338(1-2):225-32.
2. Zhang X, Meng L, Lu Q, Fei Z, Dyson PJ. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials*. 2009; 30(30):6041-6047.
3. Dowling, AP. Development of nanotechnologies. *Materials today*. 2004; 7(12):30-35.
4. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005; 9(6):674-679.
5. Kam NW, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127(16):6021-6026.
6. Prato M, Kostarelos K, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *American Chemical Society Publications*. 2008; 41(1):60-68.
7. Iijima S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature*. 1991; (354):56-58.
8. Balasubramanian K, Burghard M. Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*. Weinheim an der Bergstrasse, Germany. 2005; 1(2):180-92.
9. Souza Filho AG, Fagan SB. Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*. 2007; 30(7):1695-1703.
10. Vanhandel M, Alizadeh D, Zhang L, Kateb B, Bronikowski M, Manohara H, Badie B. Selective uptake of multi-walled carbon nanotubes by tumor macrophages in a murine glioma model. *Journal of Neuroimmunology*. 2009; 208(1-2):3-9.
11. Reilly RM. Carbon nanotubes: potencial benefits and risks of nanotechnology in nuclear medicine. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2007; (48):1039-1042.

12. 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. *Chemical Society. Reviews.* 2009; 38(7):1897-903.
13. Dresselhaus M, Dresselhaus G, Eklund P, Saito R. Carbon nanotubes. *Physics World.* 1998; 33-38
14. Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD, Prato M. Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chemical Communications.* 2005; 7(5):571-577.
15. Vajtai BR, Wei BQ, Ajayan PM. Controlled growth of carbon nanotubes *Philosophical Transactions of Royal Society of London A.* 2004; (362):2143-2160.
16. 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.* 2006; 92(1):5-22.
17. Cassel AM, Raymakers JA, Kon J, Dai H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *The Journal of Physical. Chemistry. B.* 1999; 103(31):6484–6492.
18. Popov VN. Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering R.* 2004; (43):61-102.
19. Yacaman MJ, Yoshida MM, Rendon L, Santiesteban JG. Catalytic Growth of Carbon Microtubules with Fullerene Structure. *Applied Physics Letters.* 1993; 62(2):202-204.
20. Joselevich E, Dai H, Liu J, Hata K, Windle AH. Carbon-nanotube synthesis and organization. *Carbon nanotubes, Topics in Applied Physics.* 2008; (111):101-164.
21. Jorio A, Kauppinen E, Hassanien A. Carbon-nanotube metrology. *Carbon nanotubes, Topics in Applied Physics.* 2008; (111):63-100.
22. Zhao Q & Wagner HD. Raman spectroscopy of carbon-nanotube-based composites. *Philosophical. Transactions of the Royal Society.* 2004; (362):2407-2424,

23. Lin Y, Taylor S, Li H, Fernando S, Qu L, Wang W, Gu L, Zhou B, Sun P Y. Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry*. 2004; (14):527-541.
24. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Advanced drug delivery Reviews*. 2006; (58):1460-1470.
25. Chlopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Toxicologia of Carbon. Nanomaterials*. 2006; (44):1106-1111.
26. 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 Research*. 2008; 15; 68(16):6652-60.
27. Smart S, Cassady A, Lu G, Martin D. The biocompatibility of carbon-nanotubes *Carbon*. 2006; (44):1034–1047.
28. Kateb B, Vanhandel M, Zhang L, Bronikowski MJ, Manohara H, Badie B. Internalization of MWCNTs by microglia: possible application in immunotherapy of brain tumors. *NeuroImage*. 2007; 37(1):S9–S17.
29. Hirano S, Kanno S, Furuyama A. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008; (232):244-251.
30. Cai D, Mataraza JM, Qin ZH, Huang Z, Huang J, Chiles TC, Carnahan D, Kempa K, Ren Z. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. *Nature Methods*. 2005; 2(6):449–454.
31. Kam NWS, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(22):6850–6851.
32. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, Cheng HK, Lil, Tan LP. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical Communications*. 2011; 47(18):5235–5237.

33. Hart IR. Biology of cancer. *Medicine*. 2004; 32(3):1-5.
34. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*. 2006; (12):924-35.
35. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(6):1991-2001.
36. Hanahan D.; Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*.2000 (100):57-70.
37. Burke A, Ding X, Singh R, Kraft RA, Levi-Polvachenko N, Rylander MN, Szot C, Buchanan C, Whitney J, Fisher J, Hatcher H C, D'Agostino R, Kock N D, Ajayan P M, Carroll D L, Akman S, Torti F M, Torti S V. Long-term survival following a single treatment of kidney tumor with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(31):12897-12902.
38. Brennan ME, Coleman JN, Drury A, Lahr B, Kobayashi T, Blau WJ. Nonlinear photoluminescence from van Hove singularities in multiwalled carbon nanotubes. *Optics Letters*. 2003; 28(4):266–268.
39. Gannon CJ, Cherukuri P, Yakobson BI, Cognet L, Kanzius JS, Kittrell C, Weisman RB, Pasquali M, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA. Carbon nanotube-enhanced thermal destruction of cancer cells in a noninvasive radiofrequency field. *Cancer*. 2007; 110(12):2654–2665.
40. Torti SV, Byrne F, Whelan O, Levi N, Ucer B, Schmid M, Toti FM, Akman S, Liu J, Ajayan PM, Nalamasu O, Carroll DL. Photo-dynamic therapeutics based on CNx multi-walled nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*. 2007; 2(4):707–714.
41. Hampel S, Kunze D, Haase D, Krämer K, Rauschenbach M, Ritschel M, Leonhardt A, Thomas J, Oswald S, Hoffmann V, Buchner B. Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth. *Nanomedicine*. 2008; 3(2):175–182.
42. Levi-polyachenko NH, Merkel EJ, Jones BT, Carroll DL, Stewart JH. Rapid photothermal intracellular drug delivery using multiwalled carbon nanotubes. *Molecular Pharmaceutics*. 2009; 6(4):1092–1099.

43. Burlaka A, Lukin S, Prylutska S, Remeniak O, Prylutsky Y, Shuba M, Mksimenko, Ritter U, Schatt P . Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies. *Experimental Oncology*. 2010; 32(1):48–50.
44. Xiao Y, Gao X, Taratula O, Treado S, Urbas A, Holbrook RD, Cavicchi RE, Avedisian CT, Mitra S, Savla R, Wagner PD, Srivastava S, He H. Anti-HER2. IgY antibody functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2009; 1471(9):351.
45. Huang N, Wang H, Zhao J, Lui H, Korbelik M, Zeng H. Single-wall carbon nanotubes assisted photothermal cancer therapy: animal study with a murine model of squamous cell carcinoma. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2010; 9 (42):638–648.
46. Grecco AC, Paula RF, Mizutani E, Sartorelli JC, Milani AM, Longhini AL, Oliveira EC, Pradella F, Silva VD, Moraes AS, Peterlevitz, ACeragioli HJ, Santos LM, Baranauska 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.
47. Ehrlich P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1909; (5):273–290.
48. Scharovsky OG, Matar P, Fluck MZ, Rico MJ, Rabinovich GA. From immune surveillance to tumor-immune escape: the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack. *Inmunología*. 2006; (25):2,101-114.
49. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. 1970; (13):1-27.
50. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1982; (55):329-333.
51. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immune surveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002; 3(11):991-998.
52. Malmberg K.J, Ljunggren HG. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Seminars in Cancer Biology*. 2006; (16): 16–31

53. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review Immunology*. 2004; (22):329–60.
54. Rahir G, Moser M. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(6):751-9.
55. Toes RE, Ossendorp F, Ofringa R, Melief CJ. CD4 T Cells and Their Role in Antitumor Immune Responses. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999; (189):5.
56. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological Reviews*. 2008; (222):145–154.
57. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Development*. 2000; (14):1693–1711.
58. Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *The Journal of Immunology*. 2004; (172):1,61-9.
59. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD41 T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews*. 2008; (222).
60. Weaver CT, Hatton RD, Mangar PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology*. 2007; (25):821-52.
61. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21(4):467-76.
62. Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity*. 2005; 73(1):617-21.
63. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *The Journal of immunology*. 2007; 1;178(11):6730-3.
64. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009; 114(2):357-9.

65. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*. 2007; (8):457–62.
66. Weaver CT, Hatton RD, Mangar PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*. 2007; (25):821-852.
67. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21(4):467-476.
68. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2007; 178(11):6730-6733.
69. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009; 114(2):357-359.
70. Wang L, Yi T, Kortylewskiki M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009; 206(7):1457-1464.
71. Sredni B, Tichler T, Shani A, Catane R, Kaufman B, Strassmann G, Albeck M, Kalechman Y. Predominance of TH1 Response in Tumor Bearing Mice and Cancer Patients Treated With AS 101. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88(18):1276-1284.
72. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal of Clinical Pathology*. 2005; (58):10, 1096-1100.
73. Meng J, Yang M, Jia F, Kong H, Zhang W, Wang C, Xing J, Xie S, Xu H. Subcutaneous injection of water-soluble multi-walled carbon nanotubes in tumor-bearing mice boosts the host immune activity. *Nanotechnology*. 2010; 21(14):145104.
74. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, Nomura T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006; 305:51-66.

75. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*. 2007; (8):457–462.
76. Chen W, Haedegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, Mcgrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25– T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003; (198): 1875–1886.
77. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006; 108(3):804-811.
78. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchenker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; (202): 8, 1075–1085.
79. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; (102): 419-424.
80. Larmonier N, Marron M, Zeng Y, Cantrell J, Romanoski A, Sepassi M, Thompson S, Chen X, Andreansky S, Katsanis E. Tumor-derived CD4(+)/CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2007; (56): 48–59.
81. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Galstl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003; (2): 9, 606-612.
82. Pontes ER, Matos LC, da Silva EA, Xavier LS, Diaz BL, Small IA, Reis EM, Verjovski-Almeida S, Barcinski MA, Gimba ER. Auto-antibodies in prostate cancer: humoral immune response to antigenic determinants coded by the differentially expressed transcripts FLJ23438 and VAMP3. *The Prostate*. 2006; (66):14, 1463-1473.
83. Hamrita B, Chahed K, Kabbage M, Guillier CL, Trimeche M, Chaïeb A, Chouchane L. Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breastcancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). *Cli*

- nica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry.2008; (393): 95–102.
84. Desmetz C, Cortijo C, Mangé A, Solassol J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *Journal of Proteomics*.2009; (72):982 – 988.
 85. Anderson KS, LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *Journal of Proteomic Research*, 2005; 4(4): 1123-1133
 86. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews. Immunology*. 2004; 4(12):941-952.
 87. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994; 79(2):315-328.