



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

Expressão do receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) em macrófagos, células dendríticas e células tumorais após internalização de nanotubos de carbono

Vania Daniela Ramos da Silva

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas
Co-orientadora: Profa. Dra. Elaine C. Oliveira

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 (presidente) — FEEC/UNICAMP

Prof. Dra. Silvia Pierre Irazusta — FATEC-Sorocaba

Dr. Helder José Ceragioli — FEEC/UNICAMP

Campinas – SP

2011

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

Si38e Silva, Vania Daniela Ramos da
Expressão do receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) em macrófagos, células dendríticas e células tumorais após internalização de nanotubos de carbono / Vania Daniela Ramos da Silva. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Vitor Baranauskas, Elaine Conceição de Oliveira.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Nanotubos de carbono. 2. Receptores celulares. 3. Macrófagos. 4. Células dendríticas. I. Baranauskas, Vitor. II. Oliveira, Elaine Conceição de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Expression of macrophage receptor with collagen structure (MARCO) in macrophages, dendritic cells and tumor cells after internalization of carbon nanotubes

Palavras-chave em Inglês: Carbon nanotubes, Cell receptors, Macrophages, Dendritic cells

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Silvia Pierre Irazusta, Helder José Ceragioli

Data da defesa: 30/03/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Vania Daniela Ramos da Silva

Data da Defesa: 30 de março de 2011

Título da Tese: "Expressão do receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) em macrófagos, células dendríticas e células tumorais após internalização de nanotubos de carbono"

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta:

Prof. Dr. Helder José Ceragioli:

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és

No mínimo que fazes.”

Fernando Pessoa

A todos que confiaram em mim e a todos aqueles em quem confio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à *Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP* pela oportunidade de estudo concedida.

Ao *Prof. Dr. Vitor Baranauskas* pela orientação e confiança na realização deste trabalho.

À *Profa. Dra. Elaine Oliveira* pela co-orientação, por me guiar com tanta paciência no desenvolvimento e concretização desse estudo e especialmente pela amizade.

À *Profa. Dra Leonilda M. B. dos Santos* por ceder seu laboratório para realização dos experimentos, pela contribuição indispensável no meu aprendizado e por sua leitura crítica que contribuiu para a finalização deste estudo.

À *CAPES, FAPESP e ao CNPq*, pelo apoio financeiro.

À banca examinadora, *Dr. Helder Ceragioli* pela colaboração essencial durante a realização deste trabalho e *Profa. Dra. Silvia Irazusta*, pela participação na examinação deste trabalho.

À *Profa Dra. Sara Saad*, ao *Prof. Dr. Pessine* e sua aluna *Adriana*, ao *Prof. Dr. Mario Saad* e ao *Prof. Dr. Marcelo Lancellotti* pelos empréstimos e por permitir a utilização de seus laboratórios.

Aos amigos do Laboratório de Neuroimunologia: *Ana Leda e Alessandro* por todo auxílio nos experimentos de citometria e pelas críticas que enriqueceram este trabalho. À *Rose, Fernando, Adriel e Ju* por todo aprendizado e ajuda essencial nos meus experimentos, pela companhia e pela amizade. À *Mari, Gabi, Denise, Maria Fernanda, Felipe, Cassiana, Fotini e Dani*, que de alguma forma contribuíram para esse trabalho e por tornar os dias no laboratório mais agradáveis.

Ao *Marcos, José Raimundo, Alfredo, Jaqueline e Hudson* pela disposição e ajuda nos momentos necessários.

À *minha família*, principalmente minha mãe *Vera*, meus irmãos *Dayse e Héber*, vô *Prestes*, tia *Quel* e tia *Dalva*, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim, pelo incentivo, dedicação e apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas de sempre: *Fabi, Aline e Abinara*, que mesmo distante sempre estiveram presentes em todos os momentos, ouvindo-me e ajudando. Aos amigos *Fran, Lili, Thais e Rafa*, pelo nosso tão bom encontro em Campinas, por tudo que vivemos juntos, pela amizade e carinho de sempre.

Às minhas companheiras de república: *Ju, Tati, Valéria, Flávia e Camila*, pelo período de convivência, pelos momentos divertidos ao lado de vocês, pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todas as pessoas que direta e indiretamente participaram dessa travessia acadêmica essencial na minha vida.

A *Deus*, pela vida, pelas pessoas especiais que sempre coloca no meu caminho, por me guiar e acompanhar sempre.

A todos, muito obrigada!

Resumo

A utilização da nanotecnologia emerge com potencial para aplicação na área biomédica, no diagnóstico e tratamento patológico, transporte de fármacos e transporte intracelular de moléculas. Dentre as nanopartículas, os nanotubos de carbono (NT) pertencem a uma nova classe de material para aplicação na área biomédica. Devido ao seu tamanho reduzido, os NT podem ser internalizados por diferentes células, como os fagócitos e células tumorais. Embora vários mecanismos de internalização de nanopartículas tenham sido descritos, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é bem entendido. O receptor MARCO, que é um receptor de membrana celular expresso em macrófagos, células dendríticas e algumas células endoteliais e está ligado à remoção de partículas inertes parece estar relacionado à internalização de NT. Assim, o objetivo desse estudo foi estudar a internalização de NT por macrófagos (MO), células dendríticas (DC) e células de carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), e sua relação com a expressão do receptor MARCO. Assim como, estudar a produção de citocinas pelas DC e MO incubados com os NT. Os MO foram obtidos do baço e as DC obtidas da medula óssea de camundongos C57Bl/6, e células da linhagem 3LL foram cultivadas em nosso laboratório. As células foram incubadas com NT de parede múltipla, marcados com o corante PKH26 em diferentes tempos. DC MO e 3LL internalizam os NT, porém somente os dois primeiros tipos celulares expressaram MARCO. As células 3LL apesar de internalizarem grande quantidade de NT após 12 e 24 horas, não expressam MARCO. Ao bloquear o receptor com anticorpo anti-MARCO nas DC e MO observamos diminuição na internalização dos NT. Os resultados demonstram que DC são aquelas que mais internalizam os NT e tem a maior expressão de MARCO. Estudos sobre modificações estruturais na célula foram observadas através da espectroscopia Raman. A análise da expressão gênica para citocinas demonstraram aumento na expressão de RNAm para citocina pró-inflamatória TNF α em MO e DC incubadas com NT.

Palavras chaves: *Nanotubos de carbono, receptor MARCO, macrófagos, células dendríticas e 3LL*

Abstract

The application of nanotechnology emerges with potential for application in the biomedical area, pathological diagnosis and treatment, drug transport and intracellular transport of molecules. Among the nanoparticles, carbon nanotubes (NT) belong to a new class of material for application in the biomedical area. Due to its small size, the NT can be internalized by various cells such as phagocytes and tumor cells. Although several mechanisms of internalization of nanoparticles have been described, the mechanism by which this occurs is not well understood. The MARCO receptor, which is a cell membrane receptor expressed on macrophages, dendritic cells and some endothelial cells and is linked to the removal of inert particles appears to be related to the internalization of NT. Thus, the aim was to study the internalization of NT by macrophages (MO), dendritic cells (DC) cells and Lewis lung carcinoma (3LL) and its relationship with the expression of receptor MARCO. As well as studying the production of cytokines by DC and MO were incubated with NT. The MO were obtained from the spleen and the DC obtained from bone marrow of C57BL / 6 and 3LL cell lines were cultured in our laboratory. The cells were incubated with NT (multi wall) , labeled with PKH26 dye at different times. DC, MO and 3LL internalize the NT, but only the DC and MO express MARCO. 3LL cells internalize despite large amount of NT at 12 and 24 hours, but not express MARCO. By blocking the receptor with anti-MARCO in MO and DC, were decreased the internalization of NT. The results demonstrate that DC internalize more NT than other cells and have the highest expression of MARCO. Studies on structural changes in the cell were observed by Raman spectroscopy. The analysis of gene expression for cytokines showed increased expression of mRNA for proinflammatory cytokine TNF in MO and MO incubated with NT.

Keywords: *Carbon nanotubes, MARCO receptor, macrophages, dendritic cells and 3LL.*

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanotecnologia e Nanotubos de Carbono	2
1.2 Nanotubos de Carbono e Biocompatibilidade	6
1.3 Sistema Imune	9
1.4 MARCO - Receptor de Macrófago com Estrutura de Colágeno	13
II. OBJETIVOS	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Nanotubos de carbono	19
3.2 Animais	19
3.3 Anticorpos e primers utilizados	20
3.4 Obtenção das células	20
3.4.1 Macrófagos	20
3.4.2 Células dendríticas	21
3.4.3 Células de carcinoma pulmonar de Lewis (3LL)	21
3.5 Preparação dos NT para utilização nas culturas de células	22
3.6 Marcação do NT com o corante PKH26	22
3.7 Internalização dos NT pelas células	23
3.7.1 Microscopia confocal	23

3.7.2 Citometria de fluxo	23
3.8 Avaliação da interação das células incubadas com NT por espectroscopia Raman.....	24
3.9 Expressão do receptor MARCO	24
3.10 Bloqueio do receptor MARCO e internalização de NT	24
3.11 Expressão gênica das citocinas por RT-PCR	25
3.12 Análise estatística.....	26
IV.RESULTADOS	27
4.1 Caracterização dos nanotubos de carbono	28
4.2 Internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e células tumorais (3LL) por microscopia confocal	30
4.3 Internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e células tumorais (3LL) por citometria de fluxo	32
4.4 Avaliação da interação das células incubadas com NT por espectroscopia Raman.....	36
4.5 Expressão do receptor MARCO por citometria de fluxo	38
4.6 Expressão do receptor MARCO em diferentes tempos por citometria de fluxo	40
4.7 Internalização do NT após bloqueio do receptor MARCO	41
4.8 Expressão do receptor MARCO e Internalização de NT	42
4.9 Expressão Gênica das citocinas por RT-PCR	43
V. DISCUSSÃO	45
VI. CONCLUSÕES	54
VII PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	56
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro Raman de NT.....	28
Figura 2. Imagens de nanotubos de carbono em diferentes ampliações. A e B: imagens de microscopia eletrônica de varredura (FESEM). C: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM).....	29
Figura 3. Internalização de NT pelas células por microscopia confocal. Núcleo da célula corado com DAPI (azul) e NT corado com PKH26 (vermelho). (A) Macrófago, (B) Célula Dendrítica, (C) 3LL.....	31
Figura 4. Percentual de NT-PKH26 internalizados pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL analisado por citometria de fluxo. Comparação entre os diferentes tempos de internalização de NT por cada tipo celular. * $p < 0,01$. ** $p < 0,05$	34
Figura 5. Percentual de NT-PKH26 internalizados pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL analisado por citometria de fluxo. Comparação dos tempos de internalização de NT entre as células. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$	35
Figura 6. Espectro Raman das células incubadas com NT (B, D e F) e células controle (A,C e E). MO: Macrófagos; DC: Células dendríticas; 3LL: Célula de Carcinoma Pulmonar de Lewis e NT: Nanotubos de Carbono.....	37
Figura 7. Expressão do receptor MARCO nos macrófagos, células dendríticas e células 3LL por citometria de fluxo.....	39
Figura 8. Expressão do receptor MARCO nos macrófagos, células dendríticas e 3LL incubados com NT e nas células controle. Análise por citometria de fluxo. MØ = Macrófago. DC= célula dendrítica. 3LL= Célula de Carcinoma Pulmonar de Lewis.....	39

Figura 9. Percentual de expressão do receptor MARCO nos macrófagos e células dendríticas incubados com NT em diferentes tempos (1, 2, 12 e 24 horas). Análise por citometria de fluxo. * p < 0,05; ** p < 0,01.....	41
Figura 10. Internalização de NT-PKH26 pelos macrófagos e células dendríticas após o bloqueio do receptor MARCO com anticorpo monoclonal anti-MARCO, comparados à internalização de NT-PKH26 sem bloqueio do receptor. Análise por citometria de fluxo.* p < 0,05.....	42
Figura 11. Análise da correlação entre a internalização de NT-PKH26 pelos macrófagos e células dendríticas e expressão do receptor MARCO após internalização de NT.....	43
Figura 12. Expressão gênica de mRNA das citocinas TNF α , IL-10 e IL-12 por macrófagos e células dendríticas incubadas com NT por RT-PCR.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígeno.

CVD: Deposição química a partir da fase vapor.

DC: Células Dendríticas

G-CSF: Fator de estimulação de colônia de granulócitos.

HFCVD: Deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente.

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MARCO: Receptor de Macrófago com Estrutura de Colágeno.

mDC: Célula dendrítica mieloide.

MO: Macrófagos

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade.

MWCNT: Nanotubos de carbono de parede múltipla (multi wall).

NK: células *natural killers*.

NT, CNT: Nanotubos de carbono.

pDC: Célula dendrítica plasmacitoide.

PAMPs : Padrões moleculares associados aos patógenos.

PBS: tampão fosfato-salino.

PPR: Receptores de reconhecimento padrão.

SR: Receptor *scavenger*.

SWCNT: Nanotubos de carbono de parede simples (single wall).

TLR: Tol like receptors.

Treg: Células T reguladoras.

3LL: Células de carcinoma pulmonar de Lewis.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e Nanotubos de Carbono

O conceito da nanotecnologia está na manipulação dos átomos e das moléculas com objetivo de formar novos produtos e dispositivos que permitam trazer aos produtos já existentes novas funções ou a criação de novas estruturas (PATLOLLA e colaboradores, 2009). Aplicações da nanotecnologia estão presentes em quase todos os aspectos da vida moderna. O aumento no uso dos nanomateriais em produtos de consumo, produtos químicos, equipamentos médicos, tecnologia de informações e energia, dentre outras, tem aumentado o número de publicações sobre nanomateriais. A literatura de 2009 mostrou que mais de 80.000 artigos publicados incluíam o conceito de nanotecnologia. As características físicas e químicas dos nanomateriais são essenciais para elucidar sua homogeneidade, estabilidade, reatividade, durabilidade em sistemas biológicos e potenciais de aplicação em diferentes meios (PERALTA-VIDEA e colaboradores, 2010).

Nas últimas décadas uma série de partículas em nano escala foi desenvolvida, como as gelatinas, cerâmicas, lipossomos e micelas (PATLOLLA e colaboradores, 2009). Mais recentemente, partículas novas como nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de carbono, emergem com imenso potencial para o diagnóstico e tratamento de condições patológicas, principalmente no campo da oncologia (KAM e colaboradores, 2005; PRATO e colaboradores, 2008). As nanopartículas começam a ser utilizadas para drug delivery, ou seja, a oferta de fármacos diretamente às células, com o objetivo de reduzir tanto a quantidade, como os efeitos colaterais de determinados medicamentos. Recentemente, a possibilidade de emprego dessas nanopartículas está sendo ampliada para o uso em vários campos da biologia como o transporte intracelular de DNA, RNA e proteínas (KAM e DAI, 2005, PRATO e colaboradores, 2008).

Dentre as nanopartículas, os nanotubos de carbono (NT) pertencem a uma nova classe de material com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis, que tem despertado o interesse de um grande número de pesquisadores. Os principais interesses estão em suas possíveis aplicações em diversas áreas como na química e física de materiais, engenharia, biologia e na farmacologia (BIANCO e colaboradores, 2005a; BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; SOUZA FILHO e FAGAN, 2007; LIU e colaboradores, 2008). Descobertos por IJIMA, em 1991, os nanotubos de carbono foram primeiramente sintetizados na fuligem do método de descarga por arco elétrico, sendo assim chamados devido a sua forma tubular e tamanho nanométrico. Os NT 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 condensados em uma estrutura tubular (BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

Os NT podem ser classificados em duas categorias, baseadas na sua estrutura: parede simples (single wall, SWCNT), que são constituídos de uma camada de grafeno, e parede múltipla (multi wall, MWCNT), constituídos de diversas camadas de grafeno (IJIMA; 1991; BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; REILLY, 2007; SAITO e colaboradores, 2009). Os SWCNT têm diâmetros entre 0,4 a 2,0 nm e comprimentos na faixa de 20-1000 nm, enquanto MWCNT são maiores, com diâmetros na ordem de 1,4-100 nm e comprimentos de 1 a vários micrômetros (DRESSELHAUS e colaboradores, 1998; BIANCO e colaboradores, 2005b). Os NT podem ser produzidos por diferentes técnicas (descarga por arco elétrico, abrasão por laser e deposição química a partir da fase vapor) utilizando catalisadores como: ferro, cobalto ou níquel (IJIMA; 1991; BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; REILLY, 2007; SAITO e colaboradores, 2009).

NT sintetizados por diferentes métodos apresentam propriedades físicas distintas. A qualidade, quantidade e tipo de NT sintetizado dependem do método utilizado na sua fabricação. Na técnica de descarga por arco elétrico, um plasma é gerado através de eletrodos de carbono, resultando na deposição de nanotubos de carbono sobre um substrato. Entre as limitações desse método estão a inabilidade de produzir SWCNTs ou MWCNTs separados e a presença de impurezas, sendo necessário tratamento químico e térmico para purificação. Assim como a técnica de descarga por arco elétrico, a abrasão por laser pode produzir tanto SWCNT quanto MWCNT. A técnica de abrasão por laser utiliza um feixe de laser para vaporizar um alvo de grafite misturado a um catalisador de metal de transição. A adição de um laser secundário melhora a qualidade dos NT através da otimização da vaporização do alvo e minimizando a quantidade de carbono amorfo. As limitações dessa técnica são a presença de partículas de grafite, metais e outras impurezas de carbono (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008). A técnica de deposição química a partir da fase vapor (CVD) foi usada pela primeira vez por YACAMAN e colaboradores, em 1993. Essa reação é desencadeada por um catalisador que provoca a decomposição do hidrocarboneto precursor em átomos de carbono e hidrogênio. Os parâmetros mais importantes na deposição por CVD são o gás ou solventes, o tipo de catalisador, a pressão do reator, a temperatura do substrato sobre o qual se deseja crescer o NT, entre outros. Em comparação com outros métodos o CVD se mostra eficaz por não gerar estruturas amorfas de carbono juntamente com os NT, ou seja, o material produzido por esse método é mais limpo que as demais preparações. Isso é decorrência do maior controle que se tem sobre as variáveis do processo de CVD, tais como temperatura do gás, temperatura do substrato e concentração do precursor. Os NT obtidos por CVD apresentam baixa quantidade de impurezas e tamanho mais homogêneo, no entanto a remoção de impurezas pode ser necessária (YACAMAN e

colaboradores, 1993; KONG e colaboradores, 1998; ZHANG e colaboradores, 2000; FOLDVARI e BAGONLURI, 2008).

Importantes técnicas têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura e morfologia do NT e para determinar a sua pureza. As técnicas são complementares, visto que uma técnica analítica sozinha não é capaz de definir a pureza da amostra de NT. Amostras comerciais de NT, normalmente são acompanhadas de caracterização por meio de espectros Raman, análise elementar de dados, e microscopias eletrônicas de varredura ou transmissão (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008). A espectroscopia Raman baseia-se na análise do espectro produzido pelo fenômeno de dispersão da luz quando esta interage com a matéria. Essa dispersão pode ser interpretada como um processo de colisão com troca de energia entre fótons e átomos, moléculas e íons que formam o meio material (POPOV, 2004). Segundo RYDER (2005), a espectroscopia Raman é uma ferramenta sensível na detecção de pequenas alterações estruturais e químicas, pois fornecem informações em nível molecular, permitindo a investigação de grupos funcionais, os tipos de ligações e conformações moleculares.

Os NT 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 todas essas características faz dos NT um material único, com potencial para diversas aplicações incluindo na área biomédica (LIN e colaboradores, 2004; LACERDA e colaboradores, 2006; CHLOPEK e colaboradores, 2006; SAITO e colaboradores, 2009). Recentemente, o estudo dos efeitos biológicos e as possíveis aplicações dos NT na indústria farmacêutica, diagnóstico por imagem e na medicina, resultaram em muitos investimentos e publicações nesta área.

Para muitas aplicações em sistemas biológicos, os NT precisam ser oxidados com ácidos fortes para agregar grupos hidroxilas e/ou carboxilas à sua estrutura onde as biomoléculas (ou outros nano materiais) podem ser acopladas. Os NT com grupos funcionais agregados à sua estrutura podem ser acoplados a oligonucleotídeos, proteínas e peptídeos e são mais facilmente dispersos em soluções aquosas devido às propriedades hidrofílicas, tornando-se mais eficaz em aplicações biológicas e médicas (LIN e colaboradores, 2004; PATLOLLA e colaboradores, 2009). As propriedades obtidas pela funcionalização, tais como solubilidade em água, dispersão elevada e baixa tendência de aglomeração são fatores relevantes na modulação da atividade citotóxica dos NT (LIN e colaboradores, 2004; COCCINI e colaboradores, 2010).

1.2 Nanotubos de Carbono e Biocompatibilidade

A biocompatibilidade dos materiais é um fator importante a ser considerado quando o objetivo é sua utilização em células e organismos vivos (SMART e colaboradores, 2006; ZHOU e colaboradores, 2009). Diversas pesquisas têm sido feitas em relação à biocompatibilidade do NT, no entanto, os estudos divergem quanto à sua toxicidade (MITCHEL e colaboradores, 2007). Alguns fatores podem influenciar a resposta do organismo frente a estas partículas, como o tamanho da nanopartícula e a sua solubilidade em água, a via de administração, a concentração e a dose às quais as células ou os organismos são expostos influenciam diretamente a toxicidade dos NT (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008; ZOLNIK e colaboradores, 2010). Os trabalhos usualmente diferem em relação ao número de doses, concentrações e via de administração, o que dificulta a comparação dos seus resultados.

Um estudo realizado com instilação traqueal de MWCNT em camundongos observou aumento de citocinas pró-inflamatória e de células B um dia após a administração (PARK e

colaboradores, 2009). Dados do nosso laboratório demonstraram que há aumento da proliferação dos linfócitos T após a administração *in vivo* de NT (GRECCO, 2009). No entanto, segundo KATEB e colaboradores (2007), MWCNT internalizados por fagócitos (macrófagos e micróglia) e células tumorais não alteram sua proliferação e a produção de citocinas, podendo ser usado como um veículo inerte e não tóxico em terapia anti-câncer. Estudo realizado por PALOMAKI e colaboradores (2010), também demonstram que os NT não apresentam qualquer efeito tóxico significativo em células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas). Assim o NT apresenta grande potencial para ser utilizado como carreador de substâncias no sistema biológico (BIANCO e colaboradores, 2005a).

Estudos utilizando NT como carreador de drogas têm demonstrado resultados satisfatórios na entrega e potencialização do efeito do fármaco, como por exemplo, a conjugação de NT 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; o NT apresentou biocompatibilidade, excreção eficiente e pouca toxicidade ao organismo (LIU e colaboradores, 2008). Testes *in vivo* da ação do NT conjugado 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 (CHAUDHURI e colaboradores, 2010). As pesquisas com NT na área da oncologia têm aumentado, com intuito de encontrar tratamentos mais eficazes e menos agressivos. Diferentes linhagens de células tumorais têm sido utilizadas nos testes *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo, a célula 4T1 de câncer de mama e A549 de carcinoma pulmonar humano (LIU e colaboradores, 2008; PODESTA e colaboradores, 2009). Outro modelo de tumor particularmente interessante é o carcinoma

pulmonar de Lewis (3LL ou LLC), ele é capaz de induzir metástase, portanto ideal para o teste de agentes antitumorais (O'REILLY e colaboradores, 1994; DONG e colaboradores, 1997).

THURNHERR e colaboradores, (2010), avaliaram o efeito cumulativo do MWCNT em células epiteliais de pulmão e observaram que em contraste com o asbesto, os MWCNT não induzem morte celular, mesmo depois da exposição às altas doses de MWCNT. O estudo demonstra que apesar do alto potencial de formação de espécies reativas de oxigênio, o MWCNT pode acumular e persistir nas células sem que acarrete grandes consequências em longo prazo ou induzir mecanismos adaptativos. Por outro lado, KIM e colaboradores (2010), observaram que MWCNT produziram inibição no crescimento e induziram morte celular quando incubado com células embrionárias de pulmão (WI-38), na concentração de 12.5-200 µg/ml depois de 24-72 horas de incubação. Os MWCNT apresentavam menos de 10% de impureza, atribuindo a citotoxicidade predominante ao NT.

Uma propriedade interessante e muito útil dos NT é sua capacidade de penetrar nas membranas celulares, proporcionando uma rota de entrega de cargas para o citoplasma e também para o núcleo das células. A estrutura tubular do NT favorece sua entrada das células e sua grande área de superfície proporciona adesão de pequenas moléculas, proteínas e ácidos nucléicos. Assim, podem interferir nos processos biológicos tais como sinalização e transdução (MU e colaboradores, 2009). Alguns estudos sugerem que os nanotubos entram nas células por difusão e/ou endocitose (KAM e colaboradores, 2005; MU e colaboradores, 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é bem entendido (GRANUCCI e colaboradores, 2003a; MU e colaboradores, 2009). O comportamento dos NT nas células, incluindo sua entrada, o local onde os NT permanecem e sua eliminação é determinante nos efeitos sobre as funções celulares, principalmente nas células do sistema imune (MU e colaboradores, 2009).

1.3 Sistema Imune

Os NT percorrem o organismo através da circulação sanguínea e podem ser capturados pelos macrófagos e células dendríticas presentes nos baços e nos linfonodos. Os macrófagos e células dendríticas são células especializadas em capturar microorganismos e outros antígenos e apresentá-los aos linfócitos. Esse mecanismo pode levar à proliferação dos linfócitos (JANEWAY e colaboradores, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2007). O sistema imunológico tem como principais funções prevenir infecções e erradicar as infecções estabelecidas, assim como também é responsável pela remoção de células senescentes, renovação de determinadas estruturas, participação nas interações neuroendócrinas, rejeição a enxertos, combate a células tumorais e memória imunológica (ABBAS e LICHTMAN, 2007; SCHWARTZ & COHEN, 2000).

Didaticamente os mecanismos da resposta imunológica podem ser divididos em dois grupos principais: os mecanismos da resposta imune inata e adquirida. A resposta imune inata é responsável pela proteção inicial contra infecções e estimulação da resposta adquirida e responde aos antígenos de forma não específica, não envolvendo os receptores com regiões variáveis. Dessa resposta participam principalmente as proteínas do sistema complemento, as células *natural killer* (NK), os receptores *Toll like*, os granulócitos e as células do sistema fagocítico-monocitário. Entre as propriedades mais importantes da resposta imune adquirida estão a especificidade para antígenos distintos e a memória de uma exposição prévia ao antígeno, que ocorrem devido à presença de linfócitos T e B que expressam receptores específicos, que são moléculas com regiões variáveis para o reconhecimento do antígeno, geradas pela recombinação gênica (JANEWAY e colaboradores, 2002)

Enquanto as células B reconhecem como antígeno, os peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e pequenos produtos químicos, os linfócitos T reconhecem 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 (APCs) (MCDEVITT, 2000). As APCs (células dendríticas, macrófagos ou linfócitos B) convertem antígenos protéicos em peptídeos acoplando-os às moléculas de MHC, esse é o primeiro sinal indispensável para a ativação de linfócitos T. O MHC garante que as células T só reconheçam antígenos protéicos associados a uma célula, e que o tipo certo de célula T (*helper* ou citotóxicas) responda de forma eficiente. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas APCs. A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como anergia. (JANEWAY e colaboradores, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2007). Dessa forma, as APCs desempenham importante função na imunidade inata e adaptativa, através da fagocitose de microorganismos, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos (JÓZEFOWSKI e colaboradores, 2005).

Dentre as APCs, as células dendríticas são as mais potentes apresentadoras de antígenos com alta habilidade para iniciar uma resposta imune primária (VAROL e colaboradores, 2009; BOBRY SHEV, 2010). Acredita-se que as células dendríticas se originem de precursores da medula óssea, e a maioria, as chamadas células dendríticas mieloides estão relacionadas à linhagem dos fagócitos mononucleares. As células dendríticas imaturas são encontradas sob o epitélio da maioria dos órgãos, onde sua função é a captura de antígenos estranhos e seu transporte para órgãos linfóides periféricos. Durante a sua migração para os linfonodos, as células

dendríticas amadurecem e se tornam extremamente eficientes em apresentar antígenos e estimular os linfócitos T não expostos a antígenos. As células dendríticas maduras residem nas zonas de linfócitos T dos linfonodos e neste local exibem antígenos aos linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

As células dendríticas expressam altos níveis de moléculas MHC, moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) e moléculas de adesão que são essenciais para a ativação completa da célula T, célula B e células NK (KAH-WAY e colaboradores, 2006; RABINOVICH e colaboradores, 2007). A interação entre a célula dendrítica e as células T, faz com que ocorra a secreção de um espectro de citocinas. A secreção ou a falta de secreção de interleucina como, IL-12, IL-23 e IL-10 e outras citocinas pelas células dendríticas determina sua capacidade de polarizar células T naive em Th1, Th2, células reguladoras (Treg) ou Th17 (BOBRYSHEV, 2010).

As células dendríticas podem ser divididas em dois subgrupos principais, que são: mielóide (mDC) e plasmacitoide (pDC), que diferem na morfologia, fenótipo e função (COOLS e colaboradores, 2007; SABADO e colaboradores, 2010). mDCs e pDCs expressam Tol like receptors (TLR) diferentes, mas complementares, para responder a diferentes tipos de patógenos. mDCs reconhece diversos patógenos, devido à ampla expressão TLR e ativação de IL-12. pDCs são especializadas na resposta à infecção viral, reconhece especificamente patógenos por meio do TLR7 e nucleotídeos CpG não metilados via TLR9 (GEISSMANN, 2010; SABADO e colaboradores, 2010).

Assim como as células dendríticas, os macrófagos também são células apresentadoras de antígenos. São células fagocíticas residentes nos órgãos linfóides e demais tecidos, e estão envolvidos na homeostase, via remoção de células apoptóticas e produção de fatores de

crescimento (VAROL e colaboradores, 2008; GEISSMANN, 2010). A maioria dos macrófagos expressa baixos níveis de MHC da classe II, sendo induzidos níveis mais altos pelo interferon γ (ABBAS e LICHIMAN, 2007). Eles possuem uma gama de receptores que reconhecem estruturas padrões de patógenos, tornando-os eficientes na fagocitose e produção de citocinas inflamatórias (GEISSMANN, 2010).

O primeiro evento durante a resposta imune inata nos mamíferos é ativação dos macrófagos que fagocitam os patógenos invasores e secretam citocinas, que ativam outros aspectos da resposta imune. Entre as citocinas da imunidade inata estão as citocinas IFN α e IFN β que controlam infecções virais; TNF α , IL-1 e quimiocinas que medeiam a inflamação; IL-12 que é o principal mediador da resposta imune inata a microorganismos intracelulares e indutor essencial da resposta imune adaptativa a esses microorganismos; citocinas que ativam macrófagos, especialmente IFN γ derivados da célula NK; citocinas que servem para limitar a ativação do macrófago, especialmente a IL-10 e, também IL-6 que aumenta a produção de neutrófilos na medula óssea e a síntese de proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro, tais como proteína C-reativa (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

Os macrófagos e células dendríticas apresentam em sua superfície receptores específicos responsáveis pelo reconhecimento de produtos microbianos conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PPR), que são componentes importantes da resposta imune inata (ABBAS e LICHIMAN, 2007). Estes receptores reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), comuns entre grandes grupos de microorganismos. Entre os PRRs mais estudados nos últimos anos estão as famílias dos receptores Toll-like e os receptores removedores (scavenger-SR) (ARESCHOUG e GORDON, 2008).

Os receptores scavenger compreendem uma grande família de glicoproteínas

transmembranas restritas aos macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e alguns poucos tipos celulares. Esses receptores são conhecidos por reconhecerem estruturas padrões encontradas em diferentes patógenos como LPS, proteoglicanas bacterianas e nucleotídeos CpG não metilados (MUKHOPADHYAY & GORDON, 2004; ARESCHOUG e GORDON, 2008). Os SR funcionam como co-receptor dos receptores Toll-like (TLR), principalmente do TLR2 e atuam estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos vários PAMPS (ARESCHOUG e GORDON, 2009). Essa ligação desencadeia uma resposta imune inflamatória com o objetivo de eliminar o patógeno (HOEBE e colaboradores, 2005).

1.4 MARCO - Receptor de Macrófago com Estrutura de Colágeno

Os receptores scavenger mais estudados estão o SR-A, MARCO e CD36, que têm função importante na resposta imune inata. Estes receptores são expressos em macrófagos, células dendríticas e micróglia, e são responsáveis pela fagocitose de uma variedade de microorganismos e partículas não opsonizadas (PALENCADA e colaboradores, 1999; GRANUCCI e colaboradores, 2003b; ARREDOUANI e KOBZIK, 2004; JÓZEFOWSKI e colaboradores, 2005).

O receptor MARCO é um membro distinto da classe A dos SR que funciona como um receptor de reconhecimento padrão (importante no reconhecimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas) (KRAAL e colaboradores, 2000; PEISER e colaboradores, 2002). É um receptor de estrutura colágena, expresso em macrófagos, células dendríticas e algumas células endoteliais e a sua expressão é altamente estimulada por estímulos microbianos dependente de TLR (MUKHOPADHYAY e colaboradores, 2006; HIRANO e colaboradores, 2008; THAKUR e colaboradores, 2009a). É uma proteína de membrana de 210 kDa composta de três subunidades

com cadeias de aproximadamente 52 kDa (KRAAL e colaboradores, 2000; MATSUSHITA e colaboradores, 2010).

MARCO possui importante função na resposta imune inata, pois possui atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, proteínas de baixa densidade modificadas e partículas inertes. Sua expressão é aumentada na regulação do organismo contra LPS e na sepse bacteriana sistêmica (MATSUSHITA, 2010). A expressão deste receptor nestas células pode influenciar diretamente na capacidade de internalização de antígenos, devido a sua participação no rearranjo do citoesqueleto de actina, estimulando a formação de processos dendríticos nas células, que são importantes para fagocitose dos microorganismos (GRANUCCI e colaboradores, 2003b; JÓZEFOWSKI e colaboradores, 2005; MATSUSHITA e colaboradores, 2010). O receptor MARCO também parece estar relacionado com a maturação de células dendríticas *in vitro* (MILNE e colaboradores, 2005).

JÓZEFOWSKI e colaboradores, (2005), observaram que a ausência do receptor MARCO diminui os níveis de produção de IL-12 produzido por macrófagos estimulados por LPS. O receptor MARCO também tem sido descrito como responsável pela internalização e remoção de partículas como sílica e nanopartícula de carbono (PIKKARAINEN e colaboradores, 1999; HIRANO e colaboradores, 2008; THAKUR e colaboradores, 2009a; THAKUR e colaboradores, 2009b). Segundo ROGERS e colaboradores (2009), a depleção de MARCO em camundongos demonstra drástica diminuição na remoção de partículas inertes causando aumento da inflamação e expressão de quimionas.

Estudos também demonstram a importância da expressão do receptor MARCO na resposta aos agentes infecciosos como *Mycobacterium tuberculosis*, através da sinalização TLR2/CD14. Essa ligação estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos

lipídeos presentes na membrana destes microorganismos (BOWDISH e colaboradores, 2009). GOMES e colaboradores (2009) observaram que o bloqueio da expressão de MARCO aumenta a infecção pela *Leishmania major*, sendo que o aumento da infecção bacteriana se deve à supressão da resposta imune inflamatória, demonstrando a sua importância na eliminação deste tipo de microorganismo. ROGERS e colaboradores (2009), sugerem que MARCO participe nos processos auto-imunes, após observar que esse receptor participa da remoção de células apoptóticas e sua ausência diminui a função de endocitose e fagocitose, relacionando esses fatores à progressão do lúpus eritematoso sistêmico, considerando que a liberação de antígenos que desencadeiam a formação dos auto – anticorpos são liberados por células apoptóticas.

Estudos recentes mostram que o acoplamento do MWCNT à membrana dos macrófagos e a sua internalização se dá através do receptor MARCO, e que estas células posteriormente sofrerão lise (HIRANO e colaboradores, 2008). Entender os mecanismos de entrada do NT nas células e a possibilidade do receptor MARCO interferir nesse processo é importante, considerando o aumento do número de estudos das nanopartículas na área biomédica e o interesse em utilizá-las como carreadoras de drogas, principalmente com drogas anti-neoplásicas. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo estudar a internalização de NT pelas células dendríticas, macrófagos e células tumorais, e a participação do receptor MARCO nesse evento.

II. OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo estudar a internalização de nanotubos de carbono em macrófagos, células dendríticas e células tumorais, e sua relação com a expressão do receptor MARCO “in vitro”. Também estudar a produção de citocinas pelas células dendríticas e macrófagos incubados com os nanotubos de carbono.

3.1 Nanotubos de carbono

Os NT utilizados eram de parede múltipla (MWCNT), sintetizados no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP. Os NT foram sintetizados através do método de deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente (HFCVD), crescido em substrato de cobre, recoberto com filme de polianilina e catalisado com níquel. Os hidrocarbonetos usados como fonte de carbono foram a cânfora e a acetona (CERAGIOLI e colaboradores, 2008). Os NT foram caracterizados por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura – field emission (FESEM - field emission scanning electron microscope) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6, com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. 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. Todos os procedimentos foram realizados segundo as normas propostas pelo Comitê Brasileiro de Proteção Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP, protocolo 2064-1.

3.3 Anticorpos e primers utilizados

Os anticorpos utilizados foram: anti-MARCO purificado (Mouse MARCO Affinity Purified Polyclonal Ab, AF2956 / RD Systems) e o anti-MARCO-FITC (Rat anti Mouse MARCO/FITC, MCA1849F / AbD Serotec).

Os primers GAPDH, IL-12, IL-10 e TNF α foram obtidos da Applied Biosystem (USA).

3.4 Obtenção das células

3.4.1 Macrófagos

Os macrófagos foram obtidos do baço dos animais. Após sua retirada, o baço foi macerado, acrescentado solução balanceada Hanks (Sigma Aldrich, USA) e centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi utilizada solução cloreto de amônio a 0.82% para lise das hemáceas. 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). A suspensão de células foi colocada em placa de petri e incubada na temperatura de 37°C em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão constante de 5%. Após 2 horas de incubação o sobrenadante foi descartado com as células não aderentes e utilizado tripsina para desprender os macrófagos aderidos na placa. Os macrófagos foram novamente centrifugados e ressuspensos em meio completo. Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o método de exclusão com azul de Trypan.

3.4.2 Células dendríticas

As células dendríticas foram obtidas da diferenciação *in vitro* de células retiradas da medula óssea dos camundongos. Para obtenção das células foi retirado o fêmur dos animais e injetado solução Hanks no seu interior para retirada das células. A solução contendo células retiradas da medula foi centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi utilizada solução cloreto de amônio a 0.82% para lise das hemáceas. As células em suspensão foram lavadas novamente com solução de Hanks, centrifugadas e ressuspensas em meio completo acrescido de 1µg G-CSF/100ml de meio (G-CSF: fator de estimulação de colônia de granulócitos)(Filgastrine, Blausiegel). As células foram mantidas em microplacas de cultura de 24 cavidades na concentração de 5×10^6 células/ml por 7 dias em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37°C. O meio para manutenção da viabilidade celular foi trocado a cada 48 horas. De acordo com PALOMÄKI e colaboradores (2010), após o período de sete dias as células retiradas da medula óssea, mantidas nas condições descrita acima, diferenciaram-se em células dendríticas. Assim, passado esse período, as células foram retiradas das microplacas utilizando tripsina, foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio completo com G-CSF. Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o método de exclusão com azul de Trypan.

3.4.3 Células de carcinoma pulmonar de Lewis (3LL)

A célula 3LL é uma linhagem celular de carcinoma espontâneo de pulmão isolado de camundongo C57BL/6 mantido em nosso laboratório (O'REILLY e colaboradores, 1994; DONG e colaboradores, 1997). Após descongeladas, as células 3LL foram mantidas em garrafa de cultura com meio completo suplementado com 0.5% de piruvato e 1% de MEM (MEM Non-

essential Amino Acids, Invitrogen, USA), em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37°C. As células foram repicadas a cada 48 horas e utilizadas após o terceiro repique. A determinação da viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão com azul de Trypan.

3.5 Preparação dos NT para utilização nas culturas de células

Para utilização na cultura de células os NT foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS), mantendo a concentração de 1mg/ml, posteriormente foi sonificado por 15 minutos para melhorar a dispersão do NT e esterilizados em autoclave. Em todos os experimentos a concentração de NT utilizada foi de 10µg/ml.

3.6 Marcação do NT com o corante PKH26

Para marcação dos NT foi utilizado o kit para coloração PKH26PCL (Sigma Aldrich, USA), como descrito por KATEB e colaboradores (2007). 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 NT foram primeiramente diluídos no Diluent C e posteriormente foi acrescentado o corante PKH26. Os NT juntamente com o corante foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida centrifugados a 37.000 rpm durante 3 horas a 4°C. Após a centrifugação, os NT-PKH26 foram lavados com PBS e centrifugados por 5 minutos à 1500 rpm, para retirada do excesso de corante e ressuspensos em PBS.

3.7 Internalização dos NT pelas células

Macrófagos, células dendríticas e 3LL obtidas segundo os protocolos descritos acima, foram cultivadas em microplacas de cultura de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/ml, na temperatura de 37°C, em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão constante de 5%. Posteriormente foi adicionado aos poços 10 µg/ml de NT-PKH26 e incubados em estufa com sistema de CO₂ a temperatura de 37°C. A análise da internalização foi realizada por dois métodos: microscopia confocal e citometria de fluxo.

3.7.1 Microscopia confocal

Para preparação das lâminas as células foram incubadas, sobre lamínulas de vidro, juntamente com as nanopartículas coradas. 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. As lâminas foram examinadas no microscópio confocal, Zeiss LSM 510 Meta, no mesmo dia da montagem.

3.7.2 Citometria de fluxo

As células (macrófagos, células dendríticas e 3LL) foram incubadas com NT-PKH26 na concentração de 10 µg/ml durante 1, 2, 12 e 24 horas. Após o período de incubação, as células foram retiradas das microplacas de cultura e transferidas para tubos de citometria, onde foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspensas em PBS, e posteriormente foi feita leitura no citômetro de fluxo Gallios - Beckman Coulter.

3.8 Avaliação da interação das células incubadas com NT por espectroscopia Raman

Para a realização da espectroscopia Raman a preparação das amostras e os controles se deram da seguinte forma: macrófagos, células dendríticas e 3LL foram incubadas na presença ou não de NT durante 24 horas. As células foram colocadas nas placas de cultura na concentração de 1×10^6 células/ml. Após o tempo de incubação as células foram retiradas das microplacas de cultura, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspensas em 10 μ l de PBS e mantidas no gelo até realização da espectroscopia. Foi utilizado 1 μ l da solução de células para realização do espectro Raman, que foram registrados a temperatura ambiente em um sistema Renishaw, usando laser de Infravermelho para a excitação ($\lambda=785$ nm) numa potência de cerca de 100mW. O equipamento Raman é o modelo InVia Raman Renishaw Microscopy.

3.9 Expressão do receptor MARCO

A análise da expressão do receptor MARCO foi avaliada por meio da citometria de fluxo. As células foram incubadas com NT durante 1; 2; 12 e 24 horas, após o período de incubação as células foram retiradas das microplacas de cultura, transferidas para tubos de citometria e incubadas com o anticorpo Rat anti Mouse MARCO/FITC (Serotec/MCA1849F) na temperatura de 4°C por 40 minutos e no escuro. Após a incubação com o anticorpo, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo Gallios - Beckman Coulter.

3.10 Bloqueio do receptor MARCO e internalização de NT

Para realização desse experimento as células dendríticas, tumorais e macrófagos foram colocadas em microplacas de cultura e adicionado o anticorpo anti-MARCO purificado durante 2

horas para bloqueio do receptor MARCO. Após o período de bloqueio, foi adicionado o NT-PKH26 e então as células foram incubadas durante 24 horas. As células foram mantidas em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37°C. Após o período de bloqueio do receptor e incubação das células com o NT-PKH26, as células foram retiradas das microplacas de cultura e transferidas para tubos de citometria, onde foram lavadas com PBS, centrifugadas à 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo Gallios - Beckman Coulter.

3.11 Expressão gênica das citocinas por RT-PCR

A expressão dos genes para citocinas foi avaliada por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa quantitativa (Real time PCR, RT-PCR), dos macrófagos e células dendríticas incubados com NT e comparados com as células controle. O RNAm foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen, USA), e transcritos reversamente em cDNA utilizando o High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Os primers analisados foram GAPDH, IL-12, IL-10 e TNF α (Taqman, FAM/MGB da Applied Biosystems, USA). O GAPDH foi utilizado como um 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. O GAPDH foi escolhido pelo seu padrão de expressão constitutivo. Os ensaios foram sempre realizados em duplicata. O equipamento utilizado para realizar o RT-PCR foi o StepOne (Applied Biosystems, USA).

3.12 Análise estatística

A significância estatística dos resultados foi determinada pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis. Foi considerado significativo um valor de p menor que 0,05.

4.1 Caracterização dos nanotubos de carbono

A figura 1 apresenta um espectro típico de Raman de NT. O espectro pode ser dividido em regiões de frequência 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.

Na figura 2, são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão da amostra de NT em diferentes ampliações. As imagens mostram que as amostras consistem de estruturas tubulares não-alinhadas com aglomerações emaranhadas que cobrem a superfície do substrato.

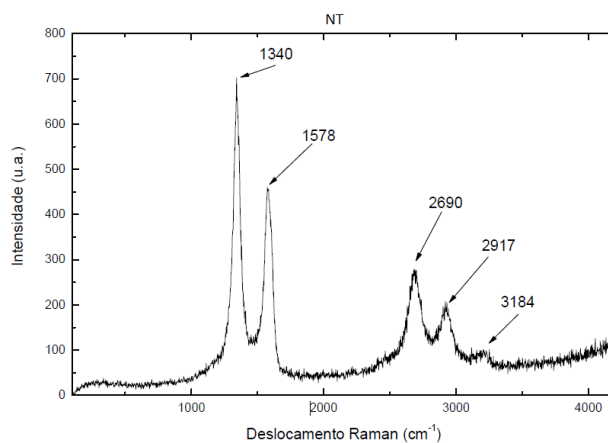


Figura 1. Espectro Raman de NT.

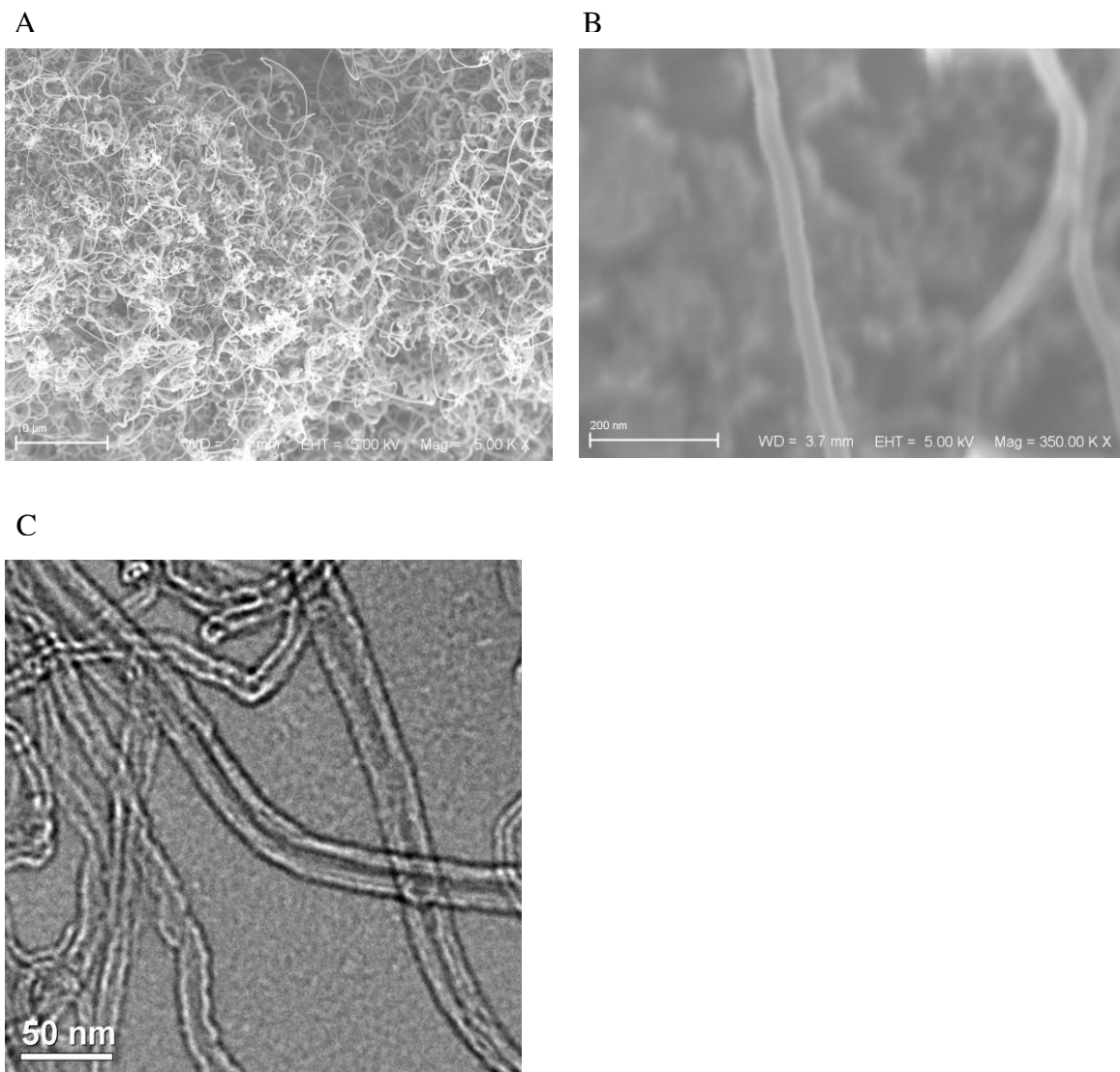


Figura 2. Imagens de nanotubos de carbono em diferentes ampliações. A e B: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FESEM). C: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM).

4.2 Internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e células tumorais (3LL) por microscopia confocal

Para avaliar a internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL, as células foram incubadas com 10µg de NT marcado com o corante PKH26 por um período de 24 horas. As imagens obtidas através de microscopia confocal demonstram que todas as células apresentam em seu citoplasma NT corados em vermelho (Figuras 3. A: macrófagos, B: células dendríticas; C: 3LL). Pode-se observar também, que em nenhuma das células, foi encontrado nanotubos de carbono corados com PKH26 no núcleo (corado em azul com DAPI), demonstrando que esta nanopartícula não atravessa a membrana nuclear.

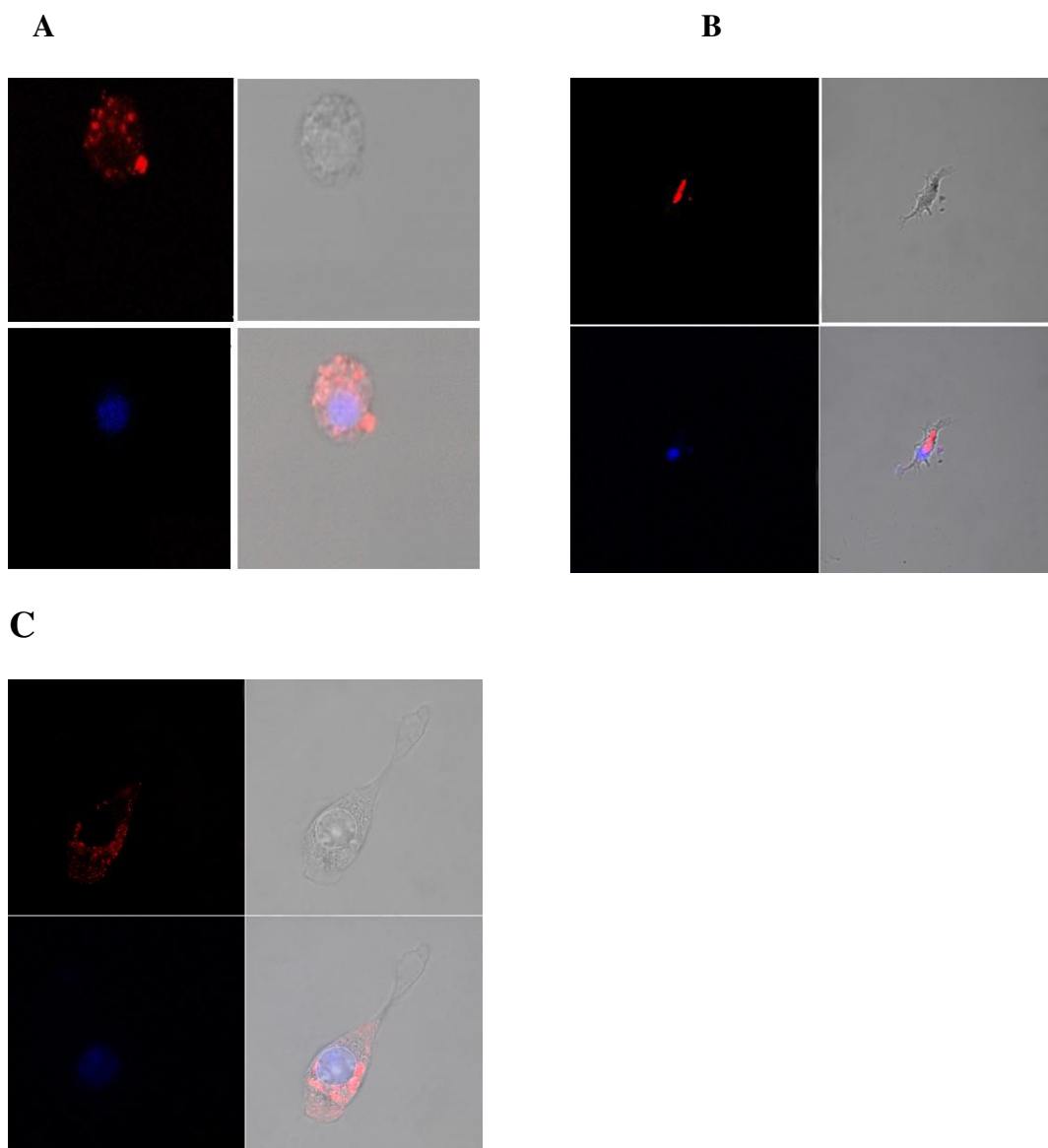


Figura 3. Internalização de NT pelas células por microscopia confocal. Núcleo da célula corado com DAPI (azul) e NT corado com PKH26 (vermelho). (A) Macrófago, (B) Célula Dendrítica, (C) 3LL.

4.3 Internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e células tumorais (3LL) por citometria de fluxo

Considerando que os dados da microscopia confocal identificaram a internalização de NT pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL, também tivemos por objetivo analisar quantitativamente a internalização de NT-PKH26 pelo método de citometria de fluxo. Para essa análise as células foram incubadas com o NT marcado com o corante PKH26 durante diferentes tempos.

O resultado demonstrado na figura 4 indica um aumento na internalização dos NT pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL com o passar do tempo. Os macrófagos apresentaram pequena internalização de NT nas primeiras horas, tendo um aumento significativo ($p < 0,05$) da internalização de NT após 24 horas de incubação com os NT. A internalização de NT pelas células dendríticas aumentou progressivamente durante os tempos analisados e essas células demonstraram ser mais eficientes na internalização dos NT que os macrófagos. Após doze horas de incubação do NT com as células dendríticas foi possível observar aumento significativo ($p < 0,05$) na internalização de NT, assim como após 24 horas de incubação dos NT com as células dendríticas há aumento significativo de partículas no interior destas células ($p < 0,01$). As células tumorais também aumentaram a internalização com o passar do tempo. No entanto, essas células praticamente não internalizaram os NT nas primeiras horas; porém, apresentaram aumento significativo da internalização de NT após 12 horas ($p < 0,05$) e 24 horas ($p < 0,01$). Os resultados demonstram que quanto maior o tempo de exposição às partículas maior será a sua internalização.

Dentre as células estudadas, as células dendríticas são as células mais eficientes na internalização dos NT, elas apresentam percentual de internalização de NT estatisticamente maior

que os macrófagos e as células tumorais em todos os tempos analisados. As células tumorais, embora apresentem baixa internalização de NT nas primeiras horas, após 12 horas e 24 horas elas têm maior capacidade de internalizar NT do que os macrófagos. Os macrófagos apresentam aumento progressivo da internalização de NT ao longo dos tempos analisados, no entanto são as células que internalizam NT em menor quantidade (Figura 5).

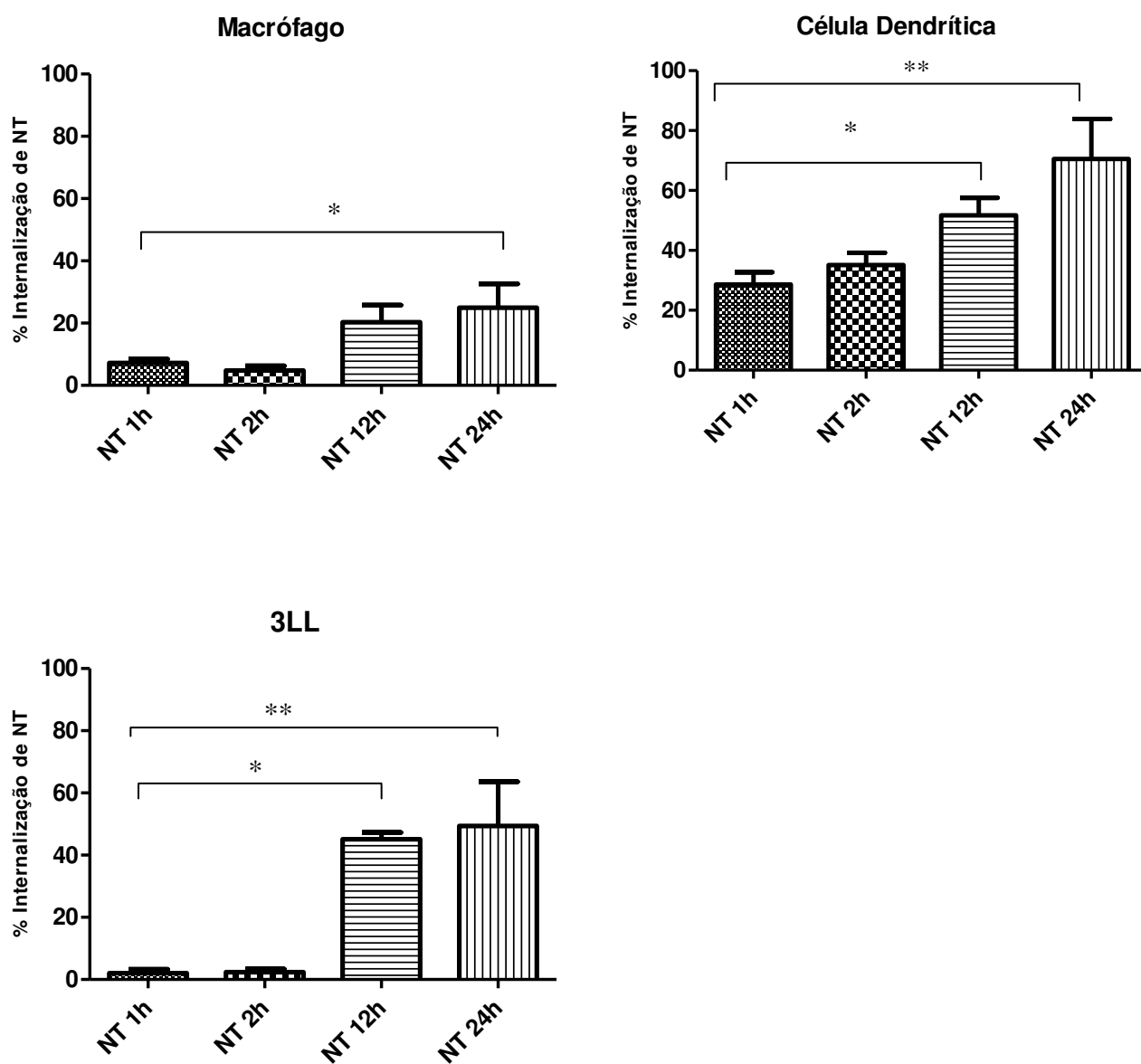


Figura 4. Percentual de NT-PKH26 internalizados pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL analisado por citometria de fluxo. Comparação entre os diferentes tempos de internalização de NT por cada tipo celular. * $p < 0,01$. ** $p < 0,05$.

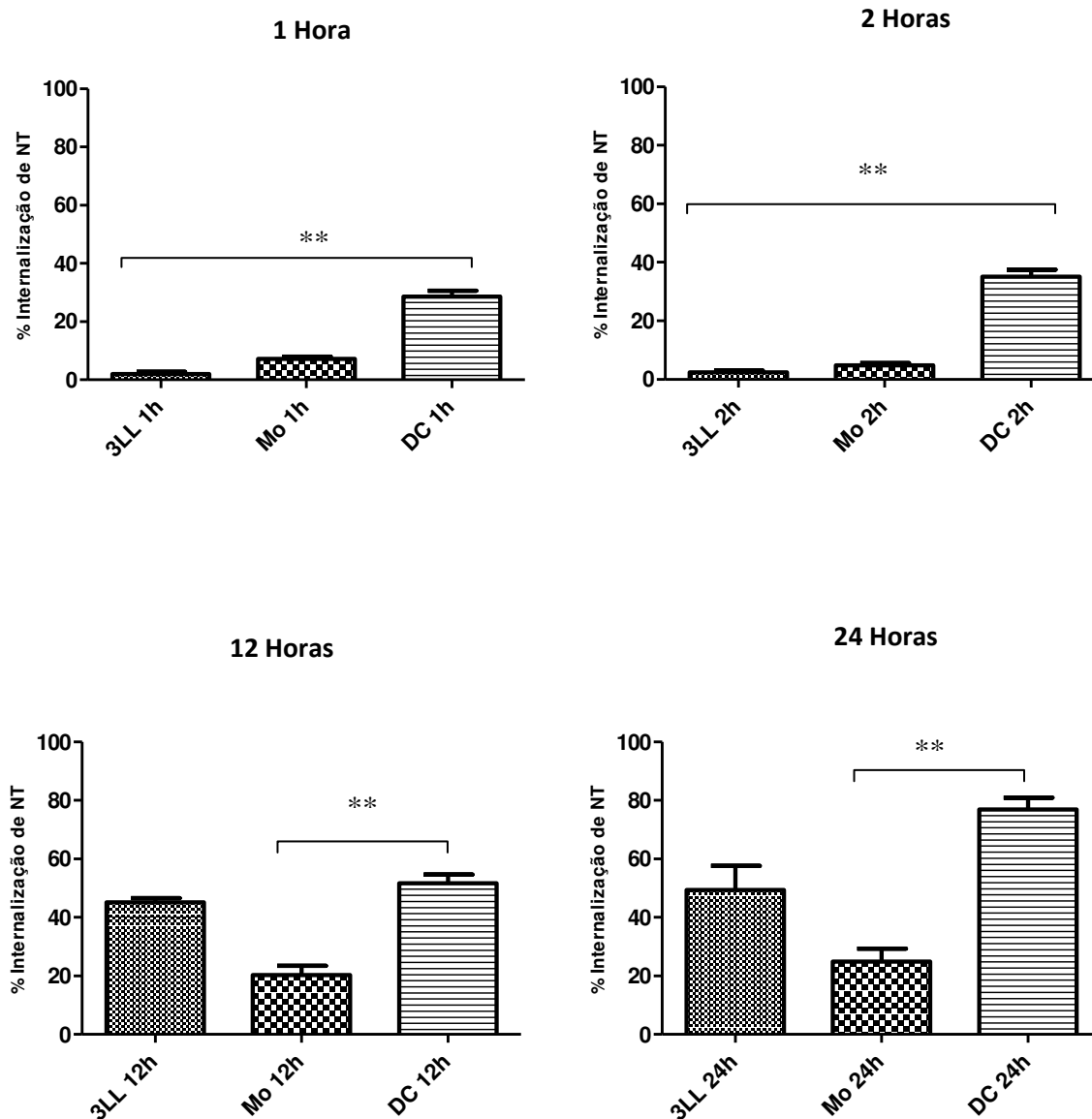


Figura 5. Percentual de NT-PKH26 internalizados pelos macrófagos, células dendríticas e 3LL analisado por citometria de fluxo. Comparação dos tempos de internalização de NT entre as células. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

4.4 Avaliação da interação das células incubadas com NT por espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi realizada das células controle (macrófagos, células dendríticas e 3LL) e das células incubadas com NT durante 24 horas, com objetivo de avaliar a interação dessas células quando incubadas com NT e verificar a presença de alteração estrutural nessas células. A figura 1 apresenta o espectro Raman do NT, onde é possível observar os picos 1340 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} , que são picos característicos dos NT. Os espectros Raman dos macrófagos, células dendríticas e células 3LL incubadas com NT são apresentados na figura 6. Esses espectros demonstram que macrófagos, células dendríticas e células 3LL incubadas com NT apresentam picos diferentes ao espectro do NT e das células controle, sugerindo interação do NT com as células e mudança na estrutura celular, evidenciada pela mudança no espectro.

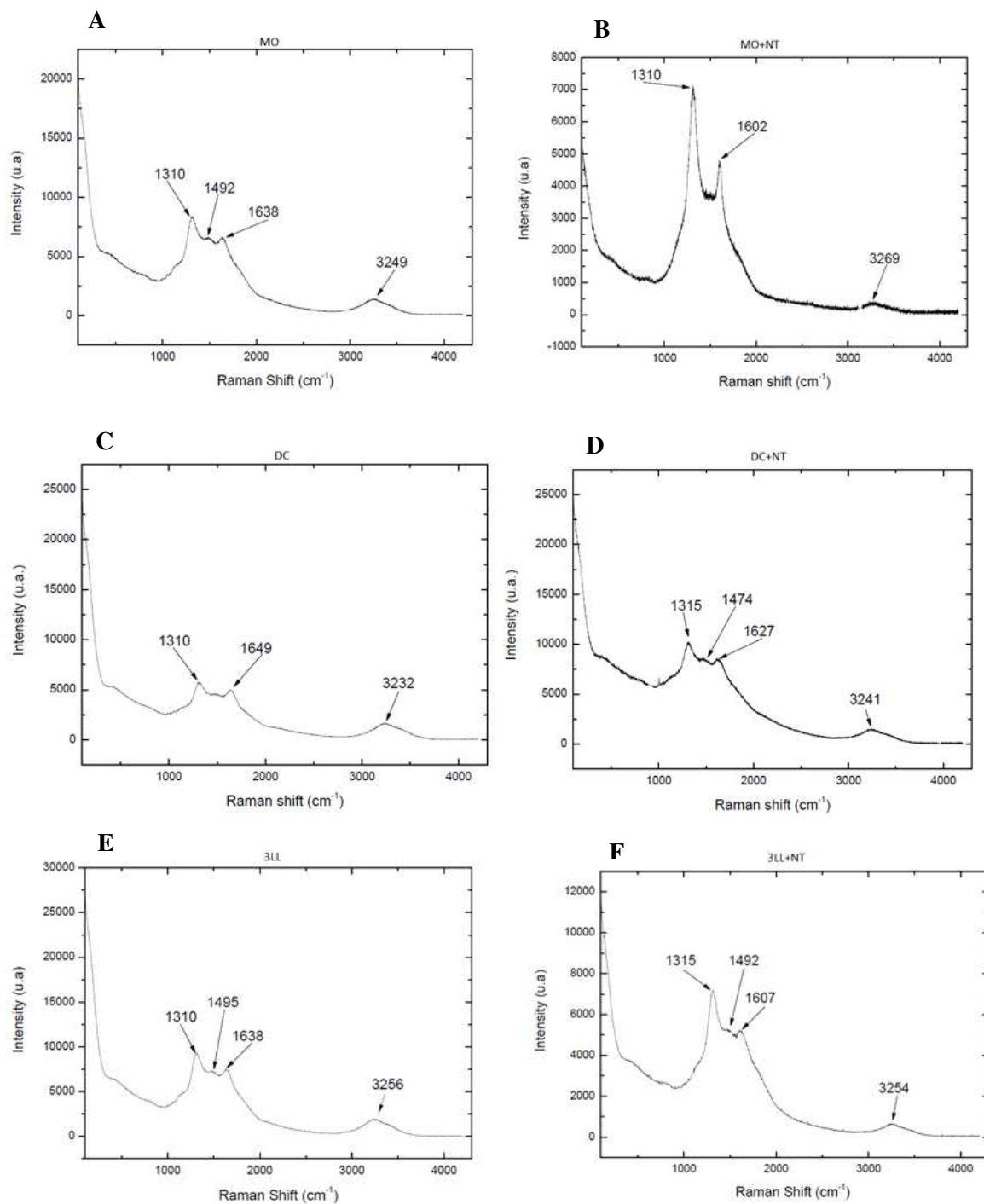


Figura 6. Espectro Raman das células incubadas com NT (B, D e F) e células controle (A,C e E).

MO: Macrófagos; DC: Células dendríticas; 3LL: Célula de Carcinoma Pulmonar de Lewis e NT: Nanotubos de Carbono.

4.5 Expressão do receptor MARCO por citometria de fluxo

A expressão do receptor MARCO foi avaliada nas células dendríticas, macrófagos e 3LL controles e das células incubadas com o NT durante 24 horas. Após o período de incubação, as células foram marcadas com o anticorpo anti-MARCO/FITC e feita análise no citômetro de fluxo. Os resultados da expressão do receptor MARCO nas células controle demonstram que os macrófagos e células dendríticas expressam o receptor MARCO constitutivamente, no entanto não foi observada expressão do receptor MARCO nas células 3LL (Figura 7 e 8). As células dendríticas expressam o receptor MARCO em maior quantidade quando comparada aos macrófagos. Ao incubar os macrófagos, células dendríticas e 3LL com o NT durante 24 horas a expressão do receptor MARCO diminui nos macrófagos e células dendríticas, enquanto nas células 3LL a ausência da expressão do receptor MARCO se mantém (Figura 8).

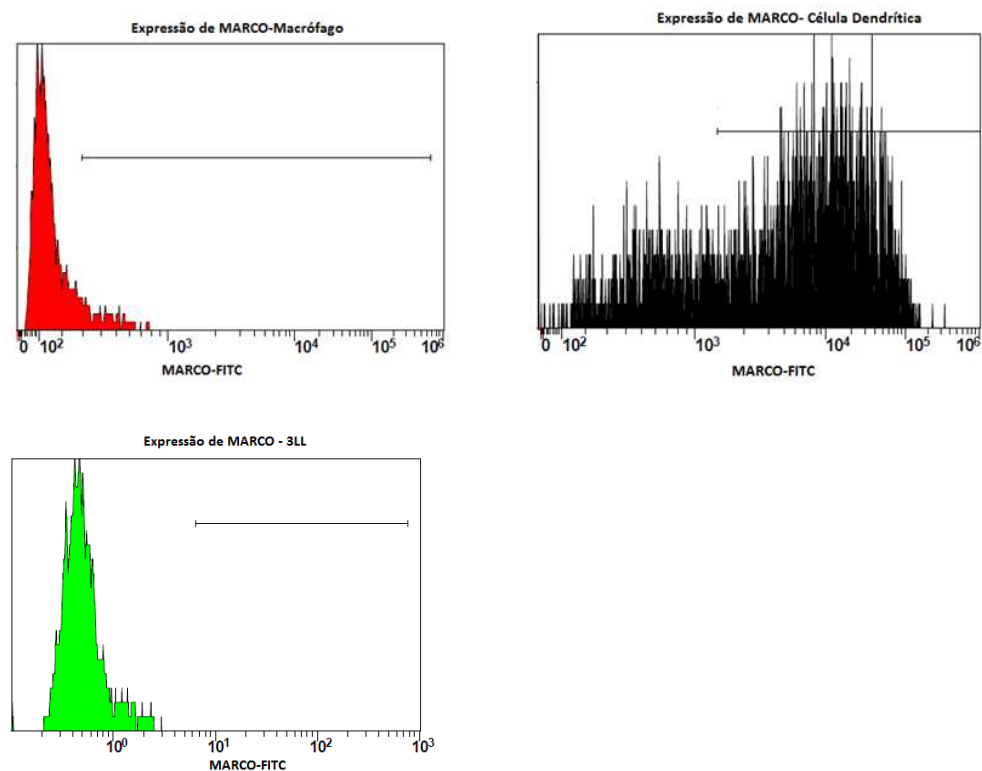


Figura 7. Expressão do receptor MARCO nos macrófagos, células dendríticas e células 3LL por citometria de fluxo

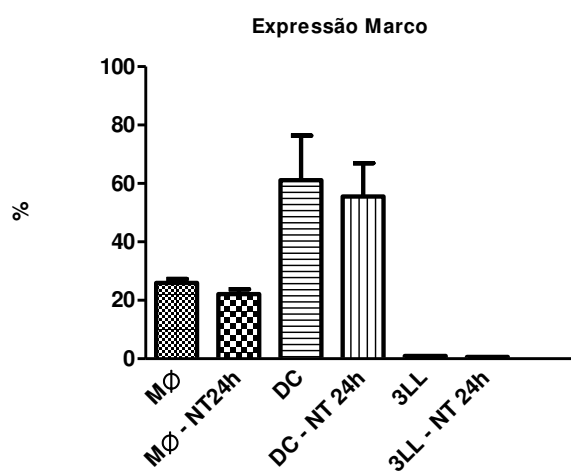


Figura 8. Expressão do receptor MARCO nos macrófagos, células dendríticas e 3LL incubados com NT e nas células controle. Análise por citometria de fluxo. MØ = Macrófago. DC= célula dendrítica. 3LL= Célula de Carcinoma Pulmonar de Lewis.

4.6 Expressão do receptor MARCO em diferentes tempos por citometria de fluxo

Confirmada a expressão constitutiva de MARCO nas células dendríticas e macrófagos no experimento anterior, visto que estas células apresentam diminuição da expressão do receptor MARCO quando incubadas com o NT por 24 horas, e que as células 3LL não expressaram o receptor MARCO, tivemos o interesse de avaliar o comportamento da expressão do receptor MARCO nas células dendríticas e macrófagos quando incubados com NT em diferentes tempos. Para isso, os macrófagos e as células dendríticas foram incubados com NT durante 1 hora, 2 horas, 12 horas e 24 horas. Após o período de incubação, as células foram marcadas com o anticorpo anti-MARCO/FITC e feita análise no citômetro de fluxo. Os resultados encontrados estão apresentados na figura 9 e demonstram diminuição na expressão do MARCO ao longo do tempo tanto nos macrófagos quanto nas células dendríticas incubadas com os NT, sendo possivelmente pela utilização do receptor MARCO para entrada dos NT nas células. Nos macrófagos a expressão do receptor MARCO diminui significativamente após 1 hora ($p < 0,05$) e 12 horas ($p < 0,01$) de incubação da célula com o NT. Enquanto nas células dendríticas a diminuição foi significativa após 2 horas ($p < 0,05$) e após 12 horas ($p < 0,01$) de incubação das células com o NT.

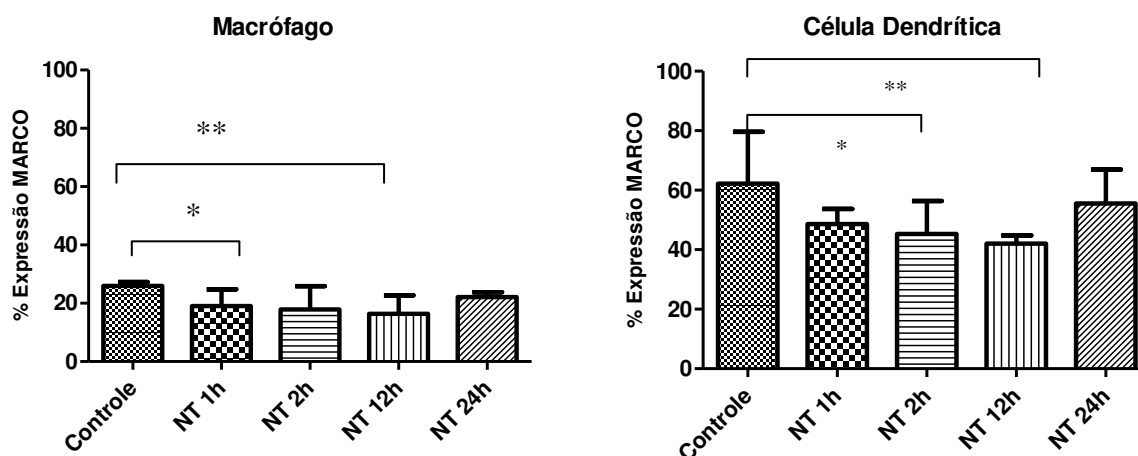


Figura 9. Percentual de expressão do receptor MARCO nos macrófagos e células dendríticas incubados com NT em diferentes tempos (1, 2, 12 e 24 horas). Análise por citometria de fluxo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7 Internalização do NT após bloqueio do receptor MARCO

Considerando que os macrófagos e células dendríticas expressam o receptor MARCO e que essa expressão diminui quando as células são colocadas em cultura com o NT, foi realizado um experimento bloqueando o receptor MARCO e posteriormente foi adicionado NT corado com o PKH26 às células e incubados durante 24 horas. Com este experimento tivemos o interesse de observar a participação do receptor MARCO na internalização de NT pelas células dendríticas e macrófagos, visto que são células que expressam o receptor MARCO. Os resultados na figura 10 demonstram a porcentagem de células que internalizaram o NT-PKH26 após o bloqueio do receptor MARCO com anticorpo monoclonal anti-MARCO. É possível observar que há uma redução significativa ($p < 0,05$) na internalização de NT ao bloquear o receptor MARCO nas células dendríticas. Nos macrófagos a redução da internalização é menor e não apresentou

diferença significativa. Os resultados sugerem que o receptor MARCO é responsável pela internalização de parte dos NT encontrados no interior destas células.

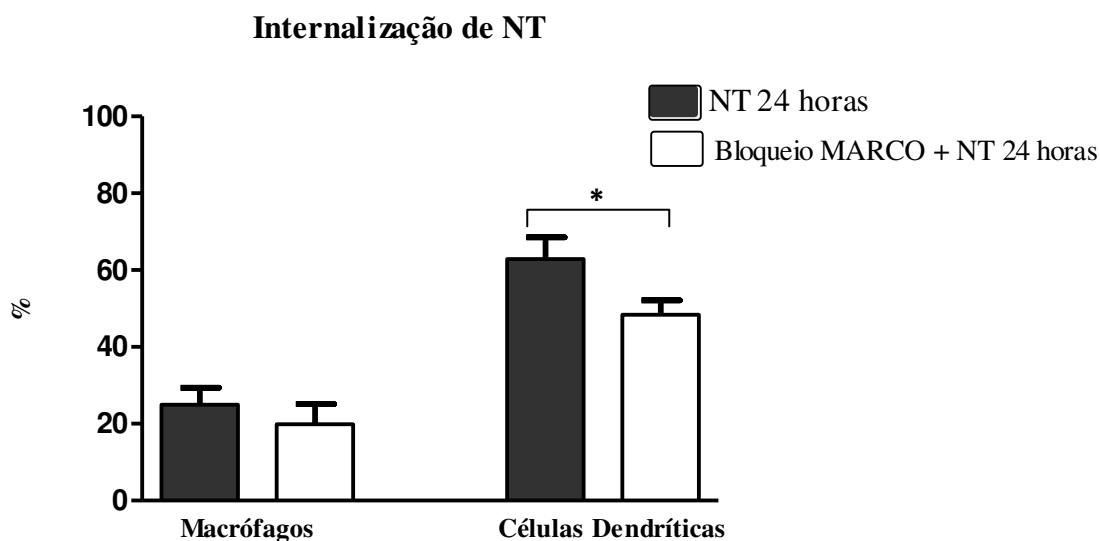


Figura 10. Internalização de NT-PKH26 pelos macrófagos e células dendríticas após o bloqueio do receptor MARCO com anticorpo monoclonal anti-MARCO, comparados à internalização de NT-PKH26 sem bloqueio do receptor. Análise por citometria de fluxo.* $p < 0,05$.

4.8 Expressão do receptor MARCO e Internalização de NT

Os resultados anteriores demonstraram que as células dendríticas e macrófagos internalizam os NT progressivamente até 24 horas e que estas células expressam o receptor MARCO constitutivamente e após serem incubadas com os NT, sendo que a expressão deste receptor diminui ao longo do período de incubação dessas células com o NT até 24 horas. Tendo em vista esses aspectos, este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se a expressão do receptor MARCO estaria relacionada à maior internalização de NT pelas células dendríticas e

macrófagos. Os resultados encontrados demonstraram que quanto maior o tempo de exposição aos NT marcado com o corante PKH26 maior é a sua internalização pelas células dendríticas e macrófagos. Também foi possível observar que com o aumento na internalização há a uma redução na expressão do receptor MARCO em ambas as células. No entanto, não houve correlação significativa entre as variáveis (Figura 11). Novamente as células dendríticas demonstram ser mais eficazes na internalização das nanopartículas e expressão do receptor MARCO.

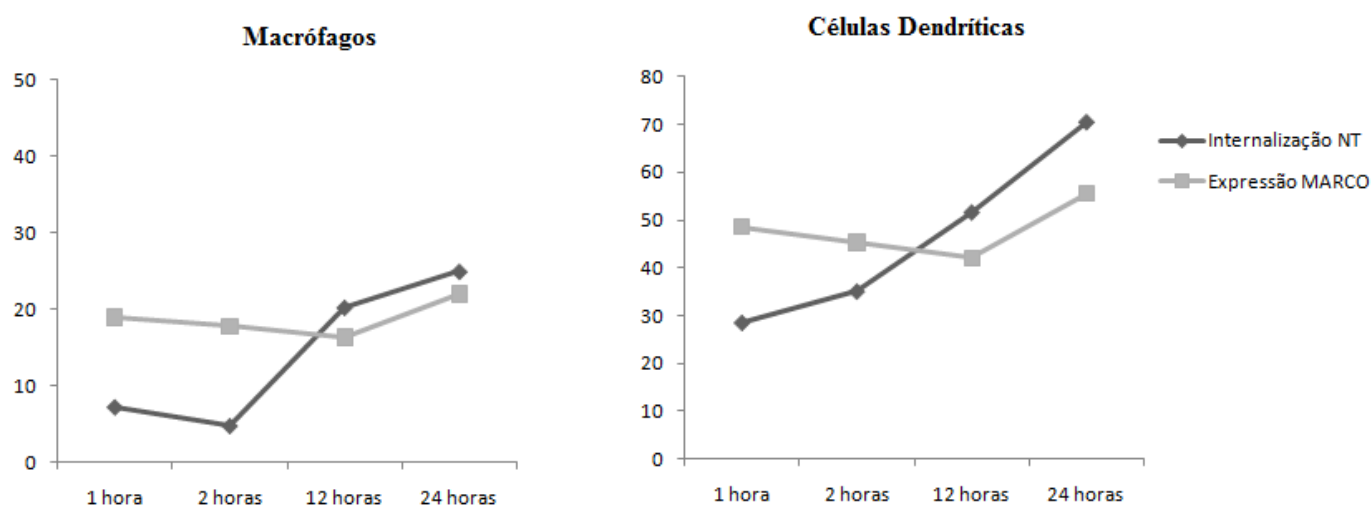


Figura 11. Análise da correlação entre a internalização de NT-PKH26 pelos macrófagos e células dendríticas e expressão do receptor MARCO após internalização de NT.

4.9 Expressão Gênica das citocinas por RT-PCR

Os macrófagos e células dendríticas foram incubadas com NT com o intuito de verificar a ativação de citocinas. Após 24 horas de incubação a expressão de mRNA das citocinas IL-12, IL-10 e TNF α foram determinadas por RT-PCR. A figura 12 mostra que os macrófagos apresentam aumento na expressão do TNF α , diminuição da citocina IL-12 e sem alterações importantes na

expressão das demais citocinas analisadas. As células dendríticas demonstraram um aumento da expressão dos genes da citocina pró-inflamatória como $\text{TNF}\alpha$ e diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 e não houve alteração na expressão da IL-12. Esses resultados sugerem que o fato destas células internalizarem as nanopartículas de carbono é suficiente para ativá-las.

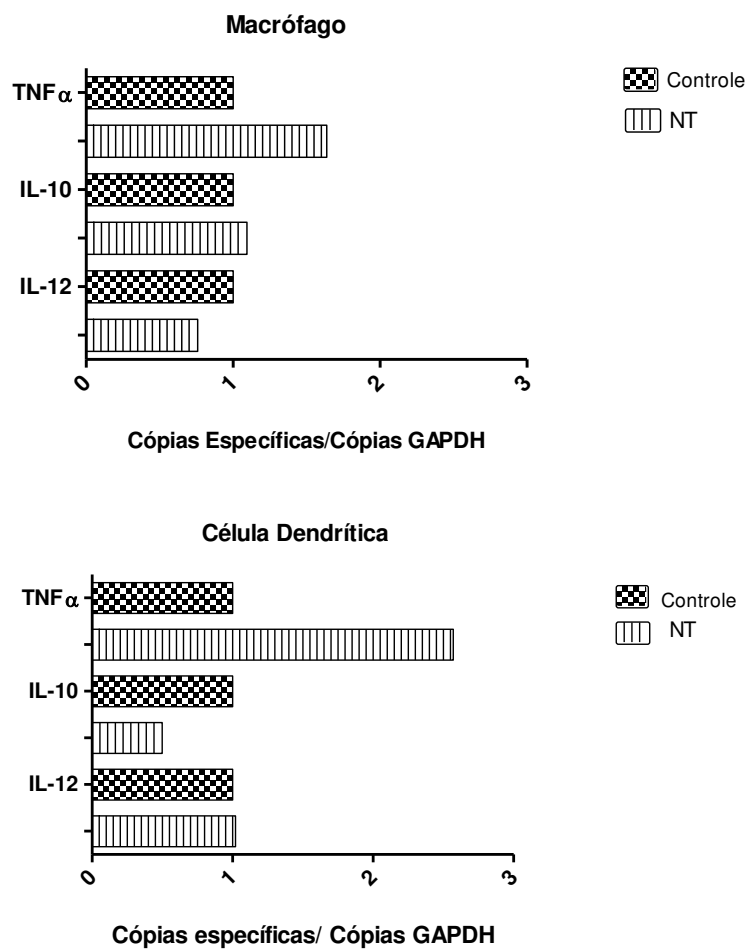


Figura 12. Expressão gênica de mRNA das citocinas $\text{TNF}\alpha$, IL-10 e IL-12 por macrófagos e células dendríticas incubadas com NT por RT-PCR.

Os resultados apresentados demonstram que os NT de múltiplas camadas têm capacidade de entrar em células do sistema imune - macrófagos e células dendríticas - e em células tumorais da linhagem 3LL. A presença dos NT marcados com o corante PKH26 no citoplasma das células foi demonstrada na figura 3. Os NT entraram nas células e permaneceram no seu citoplasma, margeando o núcleo celular. Dados da literatura confirmam que macrófagos e células dendríticas internalizam NT (YANG e colaboradores, 2006; THURNHERR e colaboradores, 2010; GEISER, 2010), assim como células tumorais (PODESTA e colaboradores, 2009). A capacidade de internalização dos NT por estas células foi confirmada através de microscopia confocal, no entanto, o método de citometria de fluxo que nos possibilitou diferenciar qual o tipo celular que foi mais eficaz na captação dos NT.

A figura 4 demonstra a capacidade de internalização dos macrófagos, células dendríticas e tumorais em função do tempo de exposição aos NT corados com PKH26 (1 hora, 2 horas, 12 horas e 24 horas). Comparativamente, os resultados indicam diferença na quantidade de partículas internalizadas pelas células nos diferentes tempos, e revelam que as células dendríticas são as mais eficazes na internalização dos NT em todos os tempos, enquanto que os macrófagos no geral são as células que menos internalizam os NT. Na figura 5 observamos que as células tumorais (3LL) não internalizam NT durante as primeiras horas (1 hora e 2 horas de incubação), no entanto, após 12 horas estas células internalizam tanto quanto as células dendríticas. Tais resultados indicam diferenças com relação à internalização de partículas por linhagens celulares distintas, sendo de bastante interesse o conhecimento deste processo para uma possível aplicação. KATEB e colaboradores (2007), investigaram diferenças na internalização de MWCNT entre células da microglia e glioma, e mostraram que esta internalização não resultava em alterações na proliferação celular e na síntese de citocinas *in vitro*, e que as células eram capazes de transportar

DNA e siRNA. Mostraram também que as células fagocíticas internalizam grandes quantidades de MWCNT em comparação com as células tumorais. Utilizando o modelo de glioma, agora *in vivo*, camundongos que receberam injeção intratumoral de MWCNT revelaram que após 24 horas a captação da maioria dos NT encontrados no local, ocorreu por macrófagos associados ao tumor (10-20%).No entanto, nenhuma toxicidade significativa foi observada nestes animais (VanHANDEL e colaboradores, 2009). Ambos os estudos sugerem que MWCNT podem ser utilizados como carreadores de drogas não tóxico em tumores cerebrais.

MU e colaboradores, (2009), observaram que os MWCNT entram até o citoplasma celular enquanto os SWCNT alcançam o núcleo das células, sendo que essa entrada é reversível. No entanto, não está esclarecido porque os MWCNT não entram no núcleo celular e como os NT podem entrar nas células e interagir com proteínas, enzimas e carrear agentes terapêuticos até as células.

A avaliação das possíveis alterações moleculares nas células que internalizam os NT foi realizada nas células dendríticas, tumorais e macrófagos utilizando a espectroscopia Raman. Através dos resultados foi possível identificar alterações no espectro das células quando incubadas com NT. Segundo RYDER (2005), a espectroscopia Raman é uma ferramenta sensível na detecção de pequenas alterações estruturais e químicas, pois fornecem informações em nível molecular, permitindo a investigação de grupos funcionais, os tipos de ligação e conformações moleculares. Em 2007, MOVASAGHI e colaboradores, com intuito de padronizar a interpretação dos espectros Raman de tecidos biológicos e assim, melhorar sua interpretação, publicou um banco de dados contendo os principais picos de espectros Raman de tecidos biológicos, as moléculas e ligações químicas que eles representam.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de se conhecer a distribuição e localização dos NT dentro da célula e também de detectar modificações químicas e estruturais após a internalização destas partículas (THURNHERR e colaboradores, 2010; MU e colaboradores, 2009; HIRANO, 2008). Outros autores relatam modificações nas células observadas através de outras metodologias. Um estudo utilizando Raios-X de microscopia de fluorescência demonstrou alterações estruturais nas células após internalização de SWCNT e MWCNT, sendo detectado um aumento significativo de cálcio nestas células (BUSSY e colaboradores, 2008). Outros estudos demonstraram alterações nos filamentos de actina nas células fagocíticas pós internalização de NT, evidenciando um rearranjo do citoesqueleto demonstrado através de prolongamentos em seu citoplasma (GRANUCCI e colaboradores, 2003b).

Quanto aos nossos resultados, observamos diferentes picos fornecidos pelo espectro Raman nas células dendríticas, macrófagos e células tumorais, quando comparadas às células não expostas aos NT (Figura 6). Acreditamos que o aparecimento dos diferentes picos se deva talvez as mesmas alterações estruturais ocorridas nas células após a internalização dos NT. No entanto, é necessário um estudo mais minucioso das alterações encontradas nestes espectros e a relação com as moléculas que eles representam e, assim identificar melhor as modificações estruturais que ocorrem nas nossas células de interesse quando em contato com NT. Outro fato importante é que apesar de diversos estudos demonstrarem que os NT são citotóxicos levando a danos irreversíveis na mitocôndria, estresse oxidativo e apoptose (HIRANO e colaboradores, 2008; CHENG e colaboradores, 2009; SRIVASTAVA e colaboradores, 2010), dados obtidos em nosso laboratório mostraram que mesmo após 48 horas de exposição dos macrófagos e células tumorais aos NT não foi detectada apoptose (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que apesar

de observadas mudanças na estrutura molecular destas células após a internalização dos NT, isto não implica diretamente na sobrevivência da célula.

A via pela qual os NT entram nas células ainda está pouco explicada, apesar do grande volume de trabalhos publicados nos últimos cinco anos (KATEB e colaboradores, 2007; FOLDVARI e BAGONLURI, 2008; PALOMAKI e colaboradores, 2010; KIM e colaboradores, 2010). Considerando-se que as células estudadas interagem com os NT e os internalizam, nosso interesse foi estudar um receptor de membrana que estivesse relacionado à remoção de partículas inertes. O receptor de membrana MARCO, que é expresso em macrófagos, células dendríticas e algumas células endoteliais (PEISER e colaboradores, 2002; ARREDOUANI e colaboradores, 2007), tem sido identificado como participante da remoção de partículas inertes como a sílica, e na exacerbação da resposta imune inata quando há ausência desse receptor (PALENCADA e colaboradores, 1999; ARREDOUANI e colaboradores, 2004; KANNO e colaboradores, 2007; THAKUR e colaboradores, 2009b). Nossos resultados identificaram a expressão do receptor de membrana MARCO em macrófagos e células dendríticas, sendo que o bloqueio desse receptor de membrana confere diminuição da internalização de NT nessas células. Esses resultados confirmam dados da literatura onde se observou que os NT se ligam à membrana celular de macrófagos via receptor MARCO (HIRANO e colaboradores, 2008). Por outro lado, os nossos dados nos levam a crer que as células tumorais da linhagem 3LL utilizam-se de outra via para internalização dos NT, já que não se identificou a expressão do receptor MARCO nessas células (Figura 8), apesar de as mesmas internalizarem grande quantidade de NT após 12 e 24 horas de exposição (Figuras 4).

A maior expressão do receptor MARCO foi observada nas células dendríticas, células estas, que se mostraram mais eficazes na internalização dos NT durante todos os tempos (1, 2, 12

e 24 horas). A diminuição na internalização dos NT após o bloqueio do receptor demonstra a participação do MARCO na internalização de parte dos NT encontrados no interior destas células (Figura 10). É possível que a utilização ou não do MARCO esteja ligada ao tamanho e comprimento dos NT. Ou seja, a captação das nanopartículas pelas células dendríticas e macrófagos poderia depender do seu tamanho, de modo que os NT menores não necessitam de receptor específico e podem penetrar a membrana.

Os macrófagos e células dendríticas tiveram uma pequena redução na expressão de MARCO após o período de 24 horas de incubação com NT, provavelmente pela internalização do receptor juntamente com os NT. HIRANO e colaboradores (2008), demonstraram que os MWCNT aderiam a diversas proteínas na membrana plasmática de macrófagos expostos aos NT. Entre estas proteínas de membrana estava o receptor MARCO, e que a adesão ao receptor poderia desencadear nas células diversos efeitos citotóxicos pela modificação da integridade da membrana.

Para avaliar os efeitos sobre a resposta imune exercidos pela incubação de macrófagos e células dendríticas com os NT, avaliou-se a expressão gênica para citocinas pró e anti-inflamatórias. Com relação à produção de citocinas, macrófagos e células dendríticas apresentaram aumento significativo na expressão gênica da citocina pró-inflamatória TNF α .

O TNF α é uma potente citocina da resposta imune inata, sendo produzido principalmente por macrófagos durante a inflamação aguda e tem importante ação na diferenciação celular (SCHILING e colaboradores, 2006), como supressora de tumores e no controle de agentes infecciosos, pois é indutora de sinais nas células alvo levando a apoptose e necrose, mantendo assim, a homeostase (IDRISS e NAISMITH, 2000; MUKAI e colaboradores, 2009). A síntese de TNF α por macrófagos pode ser induzida por estímulos biológicos, químicos e físicos, como

vírus, produtos bacterianos, células tumorais, sendo o estímulo pelo lipopolissacarídeo bacteriano o mais estudado (BISWAS e LOPEZ-COLLAZO, 2009). A expressão aumentada de genes para TNF α nos macrófagos e células dendríticas poderia suscitar contaminação dos NT por LPS, no entanto, para a realização dos ensaios os NT foram esterilizados com o objetivo de minimizar este efeito sobre as células. A maioria dos estudos relacionados à expressão do receptor MARCO e nanopartículas foi investigada no trato respiratório ou *in vitro*, demonstrando a importância deste receptor na ativação da resposta imune por ser um ativador da fagocitose e promover mudanças no citoesqueleto de macrófagos durante a fagocitose (GROLLEAU e colaboradores, 2003; PEREZ e colaboradores, 2010).

A elevação desta citocina corrobora com outros estudos que demonstram aumento de citocinas inflamatórias após a internalização de nanopartículas como TiO₂, SWCNT, MWCNT e sílica, demonstrando um importante papel dos macrófagos na remoção destas partículas, inclusive as inaladas (ARREDOUANI e colaboradores, 2005; KANNO e colaboradores, 2007; THAKUR e colaboradores, 2009; JANG e colaboradores, 2010).

Nos macrófagos também foi observada uma pequena diminuição na expressão gênica de IL-12. VanHANDEL e colaboradores, (2009) encontraram resultado semelhante de discreta diminuição na expressão gênica de IL-12 durante 24 horas após injetar MWCNT em glioma da linhagem celular GL261. No entanto, em relação às citocinas IL-6 e IL-10, o autor observou discreta e transitória diminuição até 72 horas após ser inoculado o MWCNT nestas mesmas células.

No nosso trabalho, as células dendríticas incubadas com NT tiveram diminuição na expressão gênica da citocina imunossupressora IL-10. Entre as funções da citocina IL-10 está a de inibir a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas e inibir a expressão

de co-estimuladores e de moléculas MHC da classe II nessas células. De acordo com nossos resultados, tais funções estão diminuídas pela inibição da produção de IL-10 pelas células quando incubadas com NT.

Nossos resultados indicam que os NT incubados com os macrófagos e células dendríticas durante 24 horas proporcionam aumento importante na expressão gênica de TNF α nessas células. No entanto, segundo alguns autores a produção de citocinas pelas células incubadas com NT é transitória e então seria necessário analisar um tempo maior de exposição das nossas células de interesse. KATEB e colaboradores (2007) quantificaram a expressão gênica de mRNA das citocinas IL-10, IL-1 β , e TNF α na linhagem de células da micróglia BV2 e observaram que as alterações na expressão dessas citocinas são transitórias, durante o período de 48 horas de exposição ao MWCNT.

A nanotecnologia é um campo relativamente novo e sua aplicação em medicina, ainda mais, suscitando questões sobre os possíveis danos a saúde e ao meio ambiente (DUMORTIER e colaboradores, 2006; JANG e colaboradores, 2010). Também, é recente o interesse pela participação do receptor MARCO nos processos imunes, este interesse aumentou quando se acenou a possibilidade de utilizar partículas inertes como carreadores de drogas e no tratamento de doenças como o câncer (BIANCO e colaboradores, 2008; THAKARE e colaboradores, 2010; MISRA e colaboradores, 2010).

Considerações Finais

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que células dendríticas internalizam os NT de forma bastante eficiente e também expressam o receptor MARCO em maior quantidade, e quando bloqueado o receptor observamos diminuição na internalização

destas nanopartículas. Os macrófagos internalizam menores quantidades de NT, porém expressam o receptor MARCO também em menor proporção. As células da linhagem tumoral 3LL também internalizam uma quantidade significativa de NT, porém parece não necessitar de um receptor específico para a realização deste trabalho, pois estas células não expressaram o receptor MARCO. Diante dos dados podemos inferir que o MARCO é um dos responsáveis pela internalização dos NT nestas células, e que a padronização do tamanho das partículas será necessário para entendermos a via pelas quais entram os demais NT. Existe um interesse crescente nas propriedades médicas e biológicas dos NT, e espera-se que biomateriais que contenham nanotubos de carbono sejam desenvolvidos para uso clínico. Diante disso os estudos sobre os efeitos dos NT sobre as células e os tecidos são extremamente importantes para seu uso *in vivo*.

- As células dendríticas, macrófagos e células de carcinoma pulmonar de Lewis internalizam NTs marcados com PKH26. A internalização de NT por essas células é progressiva, aumentando ao longo do tempo.
- As células dendríticas são as células que mais internalizam os NT em todos os tempos analisados.
- O receptor MARCO é expresso constitutivamente nas células dendríticas e macrófagos, sendo que nas células dendríticas é expresso em maior quantidade.
- Não foi detectada expressão do receptor MARCO nas células de carcinoma pulmonar de Lewis.
- O receptor MARCO está envolvido parcialmente na internalização dos NT pelas células dendríticas e macrófagos.
- Macrófagos e células dendríticas apresentam aumento na expressão gênica de mRNA da citocina pró-inflamatória TNF α .

VII. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a expressão gênica de citocinas nas células dendríticas e macrófagos em contato com os NT após o bloqueio do receptor MARCO.
- Estudar os mecanismos de sinalização intracelular nos macrófagos e células dendríticas após internalização de NT.
- Estudar a expressão do receptor MARCO, no modelo animal de tumor, após administração de NT.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. Elsevier, 2ª Ed., Rio de Janeiro (2007).

ARESCOUG T, e GORDON, S. *Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands*. Contrib Microbiol 15: 45-60 (2008).

ARESCOUG T, GORGON S. *Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis*. Cellular Microbiology. 11 (8): 1160–1169 (2009).

ARREDOUANI MS et.al., *Scavenger Receptors SR-AI/II and MARCO Limit Pulmonary Dendritic Cell Migration and Allergic Airway Inflammation*. J.Immunol. 178: 5912–5920 (2007).

ARREDOUANI MS, KOBZIK L. *The structure and function of marco, a macrophage class a scavenger receptor*. Cell Mol Biol. 50: 657-65 (2004).

ARREDOUANI M, YANG Z, NING YY, QIN G, SOININEN R, TRYGGVASON K, KOBZIK L. *The Scavenger Receptor MARCO Is Required for Lung Defense against Pneumococcal Pneumonia and Inhaled Particles*. J. Exp. Med. July v.200 (2): 267–272 (2004).

BALASUBRAMANIAN K, BURGHARD M. *Chemically functionalized carbon nanotubes*. Small. Feb;1(2):180-92 (2005).

BIANCO A, KOSTARELOS K, PRATO M. *Applications of carbon nanotubes in drug delivery*. Current Opinion in Chemical Biology. 9 : 674–679 (2005). a

BIANCO A, KOSTARELOS K, PARTIDOS CD, PRATO M. *Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes*. Chem Commun. 5: 571-577 (2005). b

BISWAS SK, LOPEZ-COLLAZO E. *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. Trends Immunol. 30(10):475-87 (2009).

BOBRYSHEV YV. *Dendritic cells and their role in atherogenesis*. Laboratory Investigation. July; 90 (2010).

BOWDISH DM, SAKAMOTO K, KIM MJ, KROOS M, MUKHOPADHYAY S, LEIFER CA, TRYGGVASON K, GORDON S, RUSSELL DG. *MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. Jun; 5: (6) (2009).

BUSSY C, CAMBEDOUZOU J, LANONE S, LECCIA E, HERESANU V, PINAULT M, MAYNE-L'HERMITE M, BRUN N, MORY C, COTTE M, DOUCET J, BOCZKOWSKI J, LAUNOIS P. *Carbon nanotubes in macrophages: imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy*. *Nano Lett.* 8 (9): 2659-63 (2008).

CERAGIOLI HJ, PETERLEVITZ AC, QUISPE JCR, BARANAUKAS V. *Synthesis and characterization of boron-doped carbon nanotubes*. *Journal of Physics: Conference Series* 100 (2008). doi: 10.1088/1742-6596/100/5/052029.

CHAUDHURI P, SONI S, SENGUPTA S. *Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma*. *Nanotechnology.* 21 (2010) 025102 (11pp). doi:10.1088/0957-4484/21/2/025102.

CHENG C, MULLER KH, KOZIOL KK, SKEPPER JN, MIDGLEY PA, WELLAND ME, PORTER AE. *Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells*. *Biomaterials.* 30(25):4152-60 (2009).

CHLOPEK J, CZAJKOWSKA B, SZARANIEC B, FRACKOWIAK E, SZOSTAK K, BÉGUIN F. *In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility*. *Carbon.* (44): 1106-1111 (2006).

COCCINI T, RODA E, SARIGIANNIS DA, MUSTARELLI P, QUARTARONE E, PROFUMO A, MANZO L. *Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon*

nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. Toxicology. 269 : 41–53 (2010).

COOLS N, PONSARTS P, TENDELOO VFI, BERNEMAN ZN. *Regulatory T Cells and Human Disease.* Clin Dev Immunol. 2007 ID 89195 (2008). doi: 10.1155/2007/89195.

DRESSELHAUS M., DRESSELHAUS G, EKLUND P, SAITO R. *Carbon nanotubes.* Phys World. 33-38, (1998).

DONG Z, KUMAR R, YANG X, FIDLE IJ. *Macrophage-Derived Metalloelastase Is Responsible for the Generation of Angiostatin in Lewis Lung Carcinoma.* Cell. 88: 801–810 (1997).

DUMORTIER H, LACOTTE S, PASTORIN G, MAREGA R, WU W, BONIFAZI D, BRIAND JP, PRATO M, MULLER S, BIANCO A. *Functionalized Carbon Nanotubes Are Non-Cytotoxic and Preserve the Functionality of Primary Immune Cells.* Nano Lett., 6 (7): 1522–1528 (2006).DOI: 10.1021/nl061160x.

FOLDVARI M, BAGONLURI M. *Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. (4):173-182 (2008).

GEISER M. *Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles.* Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery. 23 (2010).

GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. *Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells.* Science. February; 327 (2010).

GOMES IN, PALMA LC, CAMPOS GO, LIMA JG, DE ALMEIDA TF, DE MENEZES JP, FERREIRA CA, SANTOS RR, BUCK GA, MANQUE PA, OZAKI LS, PROBST CM, DE FREITAS LA, KRIEGER MA, VERAS PS. *The scavenger receptor MARCO is involved in*

Leishmania major infection by CBA/J macrophages. Parasite Immunol. Apr; 31(4):188- 98, (2009).

GRANUCCI F, ZANONI I, FEAU S, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. *Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity*. EMBO J. Jun; 22 (11):2546-51 (2003).a

GRANUCCI F, PETRALIA F, URBANO M, CITTERIO S, TOTA F, SANTAMBROGIO L, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. *The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia*. Blood. October; 2 (8) (2003).b

GRECCO, ACP. *Administração in vivo de nanotubos de carbono não funcionalizados na resposta de linfócitos T e B*. [Dissertação de mestrado]. Campinas: UNICAMP, (2009).

GROLLEAU A, MISEK DE, KUICK R, HANASH S, MULÉ JJ *Inducible expression of macrophage receptor Marco by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays*. J Immunol. 15;171(6):2879-88 (2003).

HIRANO S, KANNO S, FURUYAMA A. *multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 232: 244-251 (2008).

HOEBE K, GEORGEL P, DU RUTSCHMANN SX, MUDD S, CROZAT K, *et al*. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 433: 523–527, (2005).

IIJIMA S. *Helical microtubules of graphitic carbon*. *Nature*. 354:56-58 (1991).

IDRISS HT, NAISMITH JH. *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech. 50(3):184-95 (2000).

JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. *Imunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença*. ARTMED, 5ª Ed., Porto Alegre, (2002).

JANG J, LIM DH, CHOI IH. *The impact of nanomaterials in immune system*. Immune Netw. 10(3):85-91 (2010).

JÓZEFOWSKI S., ARREDOUANI M, SULAHIAN T, KOBZIK L. *Disparate Regulation and Function of the Class A Scavenger Receptors SR-AI/II and MARCO*. J. Immunol. 175; 8032-8041 (2005).

KAH-WAY L, TABARKIEWICZ J, ROLINSKI J. *Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity*. Journal of cancer research and therapeutics. 2: 35-40 (2006).

KAM NW, DAI H. Carbon Nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. J Am Chem Soc. 127: 6021-6026 (2005).

KAM NW, O'CONNELL M, WISDOM JA, DAI H. *Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction*. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 11600-5 (2005).

KANNO S, FURUYAMA A, HIRANO S. *A Murine Scavenger Receptor MARCO Recognizes Polystyrene Nanoparticles*. Toxicological Sciences. 97(2), 398–406 (2007). doi:10.1093/toxsci/kfm050.

KATEB B, VAN HANDEL M, ZHANG L, BRONIKOWSKI MJ, MANOHARA H, BADIE B. *Internalization of MWCNTs by microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors*. NeuroImage. 37: S9-S17 (2007).

KIM JS, SONG KS, JOO HJ, LEE JH, YU JI. *Determination of citotoxicity attributed to multiwall carbon nanotubes (MWCNT) in normal human embryonic lung cell (WI-38) line*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 73:1521–1529 (2010).

KONG J, CASSELL A M, DAI H. *Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon Nanotubes*. Chemical Physics Letters. 292:567–574 (1998).

KRAAL G, VAN DER LAAN LJ, ELOMAA O, TRYGGVASON K. *The macrophage receptor MARCO*. Microbes Infect. Mar; 2(3):313-6 (2000).

LACERDA L, BIANCO A, PRATO M, KOSTARELOS K. *Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology*. Advanced drug delivery Reviews. 58: 1460-1470 (2006).

LIN Y, TAYLOR S, LI H, FERNANDO KAS, QU L, GU L, WANG W, ZHOU B, SUN Y. *Advances toward bioapplications of carbon nanotubes*. J Mater Chem. 14: 527 – 54 (2004).

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. August; 68 (16) (2008).

MATSUSHITA N, KOMINE H., GROLLEAU-JULIUS A., PILON-THOMAS S., MULÉ JJ. *Targeting MARCO can lead to enhanced dendritic cell motility and anti-melanoma activity*. Cancer Immunol Immunother. 59: 875-884 (2010) .

MCDEVITT HO. *Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response*. Ann Rev Immun. 18:1-17 (2000).

MILNE SA, MCGREGOR AL, McCULLOCH J, SHARKEY J. *Increased expression of macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in mouse cortex following middle cerebral artery occlusion*. Neuroscience Letters. 383: 58–62 (2005).

MITCHELL LA, GAO J, WAL RV, GIGLIOTTI A, BURCHIEL SW, MCDONALD JD. *Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes*. Toxicological Sciences. 100 (1): 203–214 (2007).doi:10.1093/toxsci/kfm196.

MISRA R, ACHARYA S, SAHOO SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today*. 15(19-20):842-50 (2010).

MOVASAGHI Z, REHMAN S, REHMAN IU. *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. *Applied Spectroscopy Reviews*. 42(5): 493-541 (2007).

MU Q, BROUGHTON D L, YAN B. *Endosomal Leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake*. *Nano Letters*. 9 (12): 4370-4375 (2009).

MUKAI Y, SHIBATA H, NAKAMURA T, YOSHIOKA Y, ABE Y, NOMURA T, TANIAI M, OHTA T, IKEMIZU S, NAKAGAWA S, TSUNODA S, KAMADA H, YAMAGATA Y, TSUTSUMI Y. *Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant*. *J Mol Biol*. 2009 Jan 30;385(4):1221-9.

MUKHOPADHYAY S, GORDON, S. *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity*. *Immunobiology*. 209: 39-49 (2004). MUKHOPADHYAY S, CHEN Y, SANKALA M, PEISER L, PIKKARAINEN T, KRAAL, G, *et al*. MARCO, an innate activation marker of macrophages, is a class A scavenger receptor for *Neisseria meningitidis*. *Eur J Immunol*. 36: 940–949 (2006).

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*. 79: 315–328. (1994).

PALECANDA A, PAULAUSKIS J, AL-MUTAIRI E, IMRICH A, QIN G, SUZUKI H, KODAMA T, TRYGGVASON K, KOZIEL H, KOBZIK L. *Role of the scavenger receptor*

MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. J. Exp. Med. 189: 1497–1506 (1999).

PALOMÄKI J, KARISOLAA P, PYLKKÄNENA L, SAVOLAINENB K, ALENIUSA H. *Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells*. Toxicology. Jan; 267 (1-3):125-31 (2010).

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*. Mol Cell Biochem. December; (2009). DOI 10.1007/s11010-009-0356-2.

PARK E, CHO W, JEONG J, YI J, CHOI K, PARK K. *Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation*. Toxicology 259 :113–121 (2009).

PEISER L, MUKHOPADHYAY S, GORDON S. *Scavenger receptors in innate immunity*. Curr Opin Immunol. 14:123-128. 2, (2002).

PERALTA-VIDEA JR, ZHAO L, LOPEZ-MORENO ML, ROSA G, HONG J, GARDEA-TORRESDEY JL. *Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010*. J. Hazard. Mater. (2010). doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.020.

PEREZ A, WRIGHT MB, MAUGEAIS C, BRAENDLI-BAIOCCO A, OKAMOTO H, TAKAHASHI A, SINGER T, MUELLER L, NIESOR RJ. *MARCO, a macrophage scavenger receptor highly expressed in rodents, mediates dalcetrapib-induced uptake of lipids by rat and mouse macrophages*. Toxicology in Vitro. 24; 745–750 (2010).

PIKKARAINEN T, BRANNSTROM A, TRYGGVASON K. *Expression of Macrophage MARCO Receptor Induces Formation of Dendritic Plasma Membrane Processes*. The Journal of Biological Chemistry. April; 274 (16): 10975–10982 (1999).

PODESTA JE, AL-JAMAL KT, HERRERO MA, TIAN B, ALI-BOUCETTA H, HEGDE V, BIANCO A, PRATO M, KOSTARELOS K. *Antitumor Activity and Prolonged Survival by Carbon-Nanotube-Mediated Therapeutic siRNA Silencing in a Human Lung Xenograft Model*. Small. 5 (10): 1176–1185 (2009).

POPOV VN. *Carbon nanotubes: properties and application*. Materials Science and Engineering R. (43):61-102, (2004).

PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A. *Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery*. Acc Chem Res. 41(1):60-8 (2008).

RABINOVICH GA, GABRILOVICH D, SOTOMAYOR EM. *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol. 25: 267-96 (2007).

REILLY RM. *Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine*. The Journal of Nuclear medicine. 48: 1039-1042 (2007).

ROGERS NJ, LEES MJ, GABRIEL L, MANIATI E, ROSE SJ, POTTER PK, MORLEY BJ. *A Defect in Marco Expression Contributes to Systemic Lupus Erythematosus Development via Failure to Clear Apoptotic Cells*. J. Immunol. 182: 1982–1990 (2009).

RYDER AG. *Surface enhanced Raman scattering for narcotic detection and applications to chemical biology*. Current Opinion in Chemical Biology. 9:489–493 (2005). doi 10.1016/j.cbpa.2005.07.001.

SABADO RL, O'BRIEN M, SUBEDI A, QIN L, HU N, TAYLOR E, DIBBEN O, STACEY A, FELLAY J, SHIANN A KV, SIEGAL F, SHODELL M, SHAH K, LARSSON M,

LIFSON J, NADAS A, MARMOR M, HUTT R, MARGOLIS D, GARMON D, MARKOWITZ M, VALENTINE F, 8C, BORROW P, BHARDWAJ N. *Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection*. Blood. August; 6 (2010). doi 10.1182/blood-2010-03-273763.

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).

SCHLING P, RUDOLPH C, HEIMERL S, FRUTH S, SCHMITZ G. *Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation*. Cytokine. Mar 7;33(5):239-45 (2006).

SCHWARTZ M, COHEN IR. *Autoimmunity can benefit self-maintenance*. Immunology Today. (21): 265-268 (2000).

SMART SK, CASSADY AI, LU GQ, MARTIN DJ. *The biocompatibility of carbon nanotubes*. Carbon. 44: 1034-1047 (2006).

SOUZA FILHO AG, FAGAN SB. *Funcionalização de nanotubos de carbono*. Quim. Nova. 30 (7): 1695-1703 (2007).

SRIVASTAVA RK, PANT AB, KASHYAP MP, KUMAR V, LOHANI M, JONAS L, RAHMAN Q. *Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549*. Nanotoxicology. (2010) Aug 31.

THAKARE VS, DAS M, JAIN AK, PATIL S, JAIN S. *Carbon nanotubes in cancer theragnosis*. Nanomedicine (Lond). 5 (8):1277-301 (2010).

THAKUR, SA, HAMILTON R Jr, PIKKARAINEN T, HOLIAN A. *Differential binding of inorganic particles to MARCO*. Toxicological Science. 108 (2): 462-471 (2009).a

THAKUR, SA, BEAMER CA, MIGLIACCIO CT, HOLIAN A. *Critical Role of MARCO in Crystalline Silica induces Pulmonary inflammation*. Toxicological Science. 108 (2): 462-471 (2009). b

THURNHERR T, BRANDENBERGER C, FISCHER K, DIENER L, MANSER P, MAEDER-ALTHAUS X, KAISER JP, KRUG HF, ROTHEN-RUTISHAUSER B, WICK P. *A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro*. Toxicol. Lett. (2010). doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.012.

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. 208: 3–9 (2009).

VAROL C, YONA S, JUNG S. *Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes*. Immunol Cell Biol. Jan; 87(1): 30-8 (2009).

YACAMAN MJ, YOSHIDA MM, RENDON L, SANTIESTEBAN JG. *Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure*. Appl Phys Lett. 62: 202-204 (1993).

YANG, R. et.al. *Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells*. Gene Therapy. 13: 1714–1723 (2006).

ZHANG ZJ, WEI BQ, RAMANATH G AND AJAYAN PM. *Substrate-site selective growth of aligned carbon nanotubes*. Appl Phys Lett. 77:3764-3766 (2000).

ZOLNIK BS, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ A, SADRIEH N, DOBROVOLSKAIA MA. *Minireview: Nanoparticles and the Immune System*. Endocrinology. February; 151(2) (2010).

ZHOU J, DING T, PAN W, ZHU LY, LI L, ZHENG L. *Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients*. Int J Cancer. 125(7): 1640-1648 (2009).