



DANIELA FRANCHI PEREIRA SILVA CAMILO

Intervenção de Nanotubos de Carbono no
Desenvolvimento do Diabetes Espontâneo do
Camundongo “Non Obese Diabetic” (NOD)

CAMPINAS
2013



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

DANIELA FRANCHI PEREIRA SILVA CAMILO

Intervenção de Nanotubos de Carbono no Desenvolvimento do Diabetes Espontâneo do Camundongo “Non Obese Diabetic” (NOD)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Engenharia Elétrica da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Co-orientadora: Prof. Dra. Walkyria Mara Gonçalves Volpini

Esse exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Daniela Franchi Pereira da Silva Camilo, e orientada pelo Prof. Dr. Vitor Baranauskas

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

C146i Franchi Pereira da Silva Camilo, Daniela, 1975-
Intervenção de nanotubos de carbono no desenvolvimento do diabetes espontâneo do camundongo Non Obese Diabetic (NOD) / Daniela Franchi Pereira da Silva Camilo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Vitor Baranauskas.
Coorientador: Walkyria Mara Gonçalves Volpini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Nanotubos de carbono. 2. Diabetes. 3. Auto-imunidade. I. Baranauskas, Vitor, 1952-. II. Volpini, Walkyria Mara Gonçalves. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Carbon nanotubes intervention in the development of spontaneous autoimmune diabetes in Non Obese Diabetic (NOD) mice

Palavras-chave em inglês:

Carbon nanotube

Diabetes

Autoimmunity

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Vitor Baranauskas [Orientador]

Alessandro dos Santos Farias

Helder José Ceragioli

Data de defesa: 29-04-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Daniela Franchi Pereira da Silva Camilo

Data da Defesa: 29 de abril de 2013

Título da Tese: "Intervenção de Nanotubos de Carbono no Desenvolvimento do Diabetes Espontâneo do Camundongo Non Obese Diabetic (NOD)"

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias:

Prof. Dr. Helder José Ceragioli:

Vitor

Alessandro dos Santos Farias

Helder José Ceragioli

**Ao Ronaldo, que de forma especial e carinhosa me deu
força e coragem!**

**Aos meus queridos filhos Lucas e Luisa, fonte de amor
e inspiração eterna!**

Minha querida família... alicerces de amor!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela força espiritual para a realização desse trabalho.

Ao meu marido **Ronaldo** pelo amor, incentivo e por acreditar em mim.

Aos meus filhos **Lucas e Luisa** pelo amor incondicional e pela maneira especial de iluminar e alegrar minha vida.

Aos meus pais, **Wagner e Vanda** que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Sou o que sou graças a vocês!

Aos meus irmãos, **Thiago e Gustavo** pelo carinho, amizade, e por torcerem por mim.

Aos meus sogros e cunhadas, **Rosa, José, Rose e Lene** por sempre me incentivarem.

Ao meu orientador **Prof Dr Vitor Baranauskas**, que me recebeu em sua equipe e que permitiu a realização de um grande sonho!

À **Profa Dra Walkyria Mara Gonçalves Volpini** pela paciência na orientação, incentivo, compreensão e amizade. Uma pessoa iluminada, que cruzou meu caminho, e que tanto acrescentou em minha vida!

À **Profa Dra Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, por me aceitar em seu laboratório, pelo apoio e orientação constante.

Ao **Dr Alessandro dos Santos Farias** pela disponibilidade e eterna ajuda.

À **Dra Elaine Conceição de Oliveira** por todos os ensinamentos e apoio.

Ao **Dr Helder José Ceragiolli** por me encaminhar na pesquisa, pelas sugestões e oportunidades.

À **Rose**, grande amiga, pelo apoio, amizade, e ajuda constante.

Ao **Fernando, Adriel e Guilherme** a quem sempre recorro! Sem eles não seria possível este trabalho!

Aos amigos do laboratório **Mariana, Paula, Marilia, Alliny, Renata, Ingrid, Gleidy, Felipe, Alan, Ana Leda, Vinicius, Evelise, Lidiane, Carlos Otávio, Micheli, Amanda**, que de alguma maneira contribuíram para meu trabalho, pela paciência, incentivo, companheirismo e amizade.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”***

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Os nanotubos de carbono (NTC) têm sido utilizados em larga escala com finalidades industriais e avaliados, por sua estrutura e propriedades, como ferramenta para aplicação biomédica. Tanto a manipulação humana direta na produção industrial como a perspectiva do uso em medicina suscitaram amplas pesquisas para avaliar seu risco na saúde humana e o impacto ambiental. O presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos em longo prazo da administração sistêmica de nanotubos de parede múltipla (MWNTC) não funcionalizados na evolução do diabetes autoimune espontâneo do camundongo “Non Obese Diabetic” (NOD). O protocolo consistiu do tratamento de fêmeas NOD/Uni, de 6 semanas de vida, com uma única injeção intraperitoneal de MWNTC (100 µg/animal) ou do veículo Pluronic (grupo controle) e do estudo longitudinal de parâmetros clínicos, histológicos e de resposta imunológica, até 24 semanas após administração. Os dados histológicos demonstraram que o MWNTC não funcionalizado foi absorvido da cavidade peritoneal e permaneceu retido em células fagocitárias de linfonodos peri-pancreáticos, baço e fígado, onde causou uma resposta inflamatória granulomatosa, e também em parede de ductos pancreáticos, tendo confirmada sua identificação estrutural *in situ*, dentro de fagolisossomos de macrófago e no epitélio ductal, por microscopia eletrônica de transmissão (HRTEM). Apesar de não ter havido diferenças na frequência de desenvolvimento do diabetes clínico ou das características morfológicas da insulite pancreática, as fêmeas NOD tratadas com MWNTC apresentaram flutuação média de glicemias significativamente maior em relação ao grupo controle, até o final do estudo ($p < 0,0001$; Wilcoxon), com tendência a antecipação do aparecimento do diabetes clínico. Neste estudo, foi analisado um perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias previamente avaliadas no laboratório, em fase aguda após a exposição à MWNTC. Foi focada a expressão evolutiva destas citocinas em linfonodos peri-pancreáticos, sítio de ativação de células T auto-reativas contra antígenos da célula β pancreática. O MWNTC induziu uma resposta Th1 mais acentuada nos animais tratados, entre a 14^a e a 20^a semana de vida (momento de insulite extensa), com aumento da expressão de $INF\gamma$ e aumento da relação $INF\gamma/TGF\beta$ e $INF\gamma/IL10$. Esta relação permanece elevada na 30^a semana de vida das fêmeas NOD tratadas, com reduzida expressão de $TGF\beta$.

Nossos dados compreendem um dos mais longos seguimentos *in vivo* após administração sistêmica de MWNTC, demonstrando que o MWNTC não funcionalizado pode ser transportado e retido no sistema reticulo-endotelial e persistir no corpo por longo tempo, como detectado, neste estudo, em células fagocitárias de linfonodos regionais peri-pancreáticos de animais tratados, mesmo 6 meses após sua administração. Os nanotubos comerciais utilizados em diversos campos da tecnologia moderna são partículas não modificadas. Mesmo compreendendo a necessidade de se modificar a nanoestrutura para vislumbrar sua aplicação em medicina, relevância deve ser dada para o risco da exposição humana e ambiental ocorrendo neste momento. Uma resposta inflamatória crônica, com aumento da relação entre citocinas pró/anti-inflamatórias, pode ser associada a maior gravidade de doenças autoimunes em organismos suscetíveis.

Palavras-chave: nanotubo de carbono, diabetes tipo1, camundongo NOD, auto-imunidade

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT) have been used in large scale for industrial purposes and evaluated for its structure and properties as a tool for biomedical application. Both the direct human manipulation in industrial production as the prospect of use in medicine attracted extensive research to assess their risk to human health and environmental impact. This study aims to determine the long-term effects of systemic administration of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) not functionalized in the evolution of spontaneous autoimmune diabetes in "Non Obese Diabetic" mice (NOD). The protocol consisted of the treatment of 6 weeks female NOD/Uni, with a single intraperitoneal injection of MWCNT (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) or vehicle Pluronic (control group) with longitudinal study of clinical and histological parameters and immunological response until 24 weeks after administration. The histologic data demonstrated that non-functionalized MWCNT was absorbed from the peritoneal cavity and was retained on phagocytic cells of peri-pancreatic lymph nodes, spleen and liver, where it caused a granulomatous inflammatory response, and also in the wall of the pancreatic ducts, and their structural identification *in situ* was confirmed within macrophage phagolysosomes and ductal epithelium by transmission electron microscopy (HRTEM). Although there were no differences in the frequency of development of overt diabetes or morphological characteristics of pancreatic insulinitis, MWCNT treated NOD females had average blood glucose fluctuation significantly higher than control group until the end of the study ($p < 0,0001$; Wilcoxon), with a tendency to anticipate the onset of clinical diabetes. In this study we analyzed a profile of previously evaluated pro-inflammatory and anti-inflammatory in the acute phase after exposure to MWCNT. We focused on the evolutive expression of these cytokines in peri-pancreatic lymph nodes, site of activation of T cells reactive against pancreatic β cell antigens. MWCNT induced a stronger Th1 response in treated animals, between the 14th and 20th weeks of life (time of extensive insulinitis), with increased expression of $\text{INF}\gamma$ and increased ratio of $\text{INF}\gamma/\text{TGF}\beta$ and $\text{INF}\gamma/\text{IL}10$. This ratio remains high at treated NOD females aged 30 weeks, with reduced expression of $\text{TGF}\beta$. Our data comprise one of the longest *in vivo* follow-up after systemic administration of MWCNT, demonstrating that nonfunctionalized MWCNT can be transported and retained in the reticulo-endothelial system and persist in the body for

long time, as detected in this study, in phagocytic cells of peri-pancreatic regional lymph nodes, even six months after its administration. The nanotubes used in various commercial fields of modern technology are unmodified. Even comprising the need to modify the nanostructure to effective its application in medicine, importance should be given to the risk of human and environmental exposure occurring at this time. A chronic inflammatory response, with an increased ratio of pro/anti-inflammatory cytokines may be associated with greater severity of autoimmune diseases in susceptible organisms.

Keywords: carbon nanotube, type 1 diabetes, NOD mice, autoimmunity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aplicações biológicas das nanopartículas de carbono	2
1.2 Intervenção do NTC no sistema imunológico	3
1.3 Farmacocinética do NTC	4
1.4 Autoimunidade e diabetes tipo 1	5
1.5 Modelo experimental espontâneo de diabetes tipo 1: camundongo “Non Obese Diabetic” (NOD)	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos gerais	12
2.2 Objetivos específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais	15
3.2 Preparação e caracterização do MWNTC	15
3.3 Protocolo experimental	16
3.4 Identificação do diabetes clínico	18
3.5 Extração dos linfonodos peri-pancreáticos	19
3.6 Real time PCR	20
3.7 Análise histológica	20
3.8 Análise ultraestrutural	22
3.9 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Evolução da flutuação glicêmica dos camundongos NOD	24
4.2 Aparecimento do diabetes clínico	25
4.3 Evolução da insulite	26

4.4	Expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias	29
4.5	Presença de MWNTC - Histologia	32
4.5.1	Aspectos macroscópicos	32
4.5.2	Aspectos microscópicos	34
4.5.2.1	Fase aguda	34
4.5.2.2	Fase a longo prazo	36
5.	DISCUSSÃO	43
5.1	Efeito do MWNTC não funcionalizado no desenvolvimento do diabetes do camundongo NOD.....	44
5.1	Efeito do MWNTC não funcionalizado no desenvolvimento do diabetes do camundongo NOD reticulo-endotelial e pâncreas de fêmeas NOD tratadas	49
6.	CONCLUSÃO	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8.	ANEXOS	58

1.1 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

As nanopartículas de carbono (nanotubos ou nanofibras) são compostas por anéis de benzeno e sua utilização na eletrônica molecular e armazenamento energético estão bem descritas na literatura (BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; SOUZA FILHO e FAGAN, 2007). As nanopartículas podem ser diversificadas em tamanhos (diâmetro variando de 0,4 a 100 nm e comprimento de até 1 μm), e serem internalizadas pelas células. Recentemente, diferentes laboratórios têm “funcionalizado” as partículas de carbono, no sentido de adsorver moléculas de proteínas, DNA e RNA em sua superfície, intencionando alterar o desenvolvimento e função celulares (LAM *et al.*, 2006).

Os nanotubos de carbono (NTC) podem apresentar estruturas de parede simples (Single-walled – SWNTC) ou de parede múltipla (Multi-walled – MWNTC). Os NTC podem ser produzidos por diferentes técnicas como descarga por arco elétrico, ablação por laser e deposição química a partir da fase vapor. Pode-se utilizar catalisadores como: ferro, cobalto ou níquel (IJIMA; 1991; BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; REILLY, 2007; SAITO *et al.*, 2009). MWNTC são produzidos no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (Nano Eng) através do processo de deposição química a partir da fase vapor (CVD), usando fontes de hidrocarbonetos como o etanol, acetona ou cânfora, em substratos de cobre, previamente cobertos com polímeros, dopados ou não com metais (CERAGIOLI *et al.*, 2008a). Os nanotubos e nanofibras podem também ser dopados com boro (CERAGIOLI *et al.*, 2008b). A caracterização morfológica e estrutural do NTC é feita por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (FESEM) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) (JORIO, KAUPPINEN, HASSANIEN, 2008; ZHAO, WAGNER, 2004).

A aplicação dessas partículas no campo biológico, no entanto, está apenas começando. Estudos demonstram que, dependendo da via de entrada e da quantidade de nanopartículas administradas, elas podem influir, direta ou indiretamente, suprimindo ou ativando a resposta imune (POLAND *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009; FOLDVARI e BAGONLURI, 2008; ZOLNIK *et al.*, 2010). As nanopartículas podem ativar diferentes vias de sinalização intracelular, principalmente em macrófagos e células dendríticas, influenciando a apresentação de antígeno e, conseqüentemente, a resposta imune que seria desencadeada a seguir (HERRERO *et al.*, 2009). Alguns estudos mostraram os

efeitos tóxicos da inalação de partículas de carbono. A internalização destas partículas por macrófagos alveolares resulta em forte resposta inflamatória e deposição de tecido fibroso no pulmão, semelhante à exposição à sílica e ao asbesto (MAYNARD *et al.*, 2004; LAM *et al.*; 2004; YANG *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2012).

A perspectiva de aplicações generalizadas destes materiais em medicina suscitou a investigação sobre sua segurança na saúde humana. Por outro lado, a manipulação em grande escala de nanotubos de carbono para fins industriais aumentou a exposição humana direta e, conseqüentemente, a investigação de qualquer efeito crítico em nossa saúde.

Atualmente, há, portanto uma preocupação quanto ao destino e transporte das nanopartículas, além da necessidade de se entender os efeitos sobre a saúde, riscos de segurança na manipulação industrial e impacto sobre o meio ambiente (PAUTLER, BRENNER, 2010).

1.2 INTERVENÇÃO DO NTC NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Vários estudos foram realizados recentemente no Laboratório de Imunologia, IB-UNICAMP, em projetos em parceria com a REDE NANOBIOTEC DA CAPES – 2008.

Inicialmente, constatou-se que o MWNTC, administrado *in vivo* a camundongos C57Bl/6 estimula a resposta imune celular e humoral. O MWNTC foi internalizado por macrófagos, ativando-os a produzir interleucina 12 (IL-12), o que induziu uma resposta proliferativa dos linfócitos T à mitógeno não específico (OVA). Evidenciou-se aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), além do aumento da produção de anticorpos anti-OVA. (GRECCO *et al.*, 2011).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o NTC foi interiorizado por macrófagos e células dendríticas, envolvendo o receptor MARCO, expresso por estas células. Houve ativação da produção de TNF α , sugerindo uma propriedade pró-inflamatória dessas partículas (SILVA, 2011).

A administração sistêmica de MWNTC em animais com carcinoma de Lewis induziu aumento da expressão de INF γ com simultânea diminuição de IL1, TNF α , IL10 e TGF β , reduzindo significativamente o crescimento tumoral, devido à ativação do sistema

imunológico (PAULA, 2012).

No modelo experimental de esclerose múltipla (EAE), doença autoimune do sistema nervoso central, comprovou-se que as células apresentadoras de antígeno (APCs), ao internalizarem MWNTC *in vitro*, produzem IL-27 e esta citocina interfere no desenvolvimento das células Th17 encefalitogênicas, causando uma doença menos severa no animal (MORAES *et al.*, 2013).

Outra análise do modelo de EAE demonstrou que, quando o NTC estava presente na imunização dos animais com a proteína básica de mielina (MPB), o neuroantígeno, houve uma significativa redução da gravidade da doença. Foi sugerido que a interiorização dos nanotubos inibiria a apresentação do autoantígeno para os linfócitos T, com consequente proteção ao desenvolvimento da doença (MIZUTANI, 2009).

1.3 FARMACOCINÉTICA DO NTC

Devido ao potencial de utilização das nanoestruturas na medicina, viu-se a necessidade de se estudar o comportamento destas estruturas dentro do organismo.

Vários estudos farmacocinéticos foram realizados para analisar o clearance plasmático de NTC e sua distribuição tissular, sobretudo em curto prazo, após administração sistêmica em roedores. Apesar da difícil comparação entre eles, decorrente de diferentes metodologias (doses, veículos, funcionalizações ou não), foi demonstrado que o NTC é rapidamente removido da corrente sanguínea, em poucas horas (meia vida entre 3 a 5 horas) (SINGH *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2007; LACERDA *et al.*, 2008; CLICHICI *et al.*, 2012).

Entretanto, RIVIERE (2009) critica a análise farmacocinética baseada apenas em amostras de sangue e coloca a importância da via linfática no transporte das nanopartículas, que poderiam ter persistência prolongada no corpo, em tecidos que compõem o sistema reticulo-endotelial.

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos, encontrados em todos os órgãos e tecidos conjuntivos e, juntamente com as células dendríticas podem capturar antígenos estranhos e transportá-los para órgãos linfoides (ABBAS *et al.*, 2012). Portanto, é importante considerar se os nanotubos de carbono, enquanto são facilmente eliminados do sangue, podem persistir no corpo através da absorção do sistema linfático.

Recentemente, demonstrou-se que os nanotubos de carbono funcionalizados com IgG podem ser biodegradados *in vitro* pela enzima mieloperoxidase dos neutrófilos humanos e parcialmente por macrófagos, que contêm níveis mais baixos desta enzima (KAGAN *et al.*, 2010). Este estudo aborda o processo de biodegradação como uma maneira para a redução dos efeitos pró-inflamatórios de nanotubos de carbono desde que usados em concentrações apropriadas que não excedam a capacidade do sistema enzimático. Por outro lado, os autores descrevem que apenas 30% do NTC não-funcionalizado foi degradado nas mesmas condições. Estes dados podem explicar, pelo menos em parte, a indução da inflamação aguda e a formação de granulomas observados em diferentes modelos experimentais utilizando NTC não modificado ou doses com potencial tóxico.

Poucos estudos descrevem o efeito das nanopartículas em longo prazo após sua administração. Foi demonstrado *in vitro* que a presença e acúmulo de MWNTC não impactou a viabilidade e funcionalidade das células ao longo de 6 meses (THURNHERR *et al.*, 2011).

Outro trabalho sugere que, mesmo sendo o nanotubo um material estável contra biotransformação, 3 meses após administração, 20% é eliminado pelos macrófagos do sistema reticulo-endotelial (DENG *et al.*, 2007).

Segundo o estudo de YAMAGUCHI e colaboradores (2012), o MWNTC mantém estimulado o sistema imunológico e as respostas inflamatórias após 34 semanas de administração. Houve também mudanças morfológicas no interior dos órgãos, com formação de granuloma e severa fibrose, revelando a presença de macrófagos no local.

1.4 AUTOIMUNIDADE E DIABETES TIPO 1

Indivíduos normais são tolerantes aos seus antígenos porque os linfócitos que reconhecem antígenos próprios são destruídos ou inativados.

Ao encontrar antígenos específicos, os linfócitos podem iniciar uma resposta imunológica a este antígeno ou estas células podem ficar inativas ou ser eliminadas, levando a tolerância. A tolerância imunológica é definida como a não responsividade a um antígeno (ABBAS *et al.*, 2012).

A tolerância central desempenha um papel fundamental na tolerância imunológica,

juntamente com uma rede de outros mecanismos de tolerância periférica que, juntas, mantêm um repertório imunológico apto para responder a um conjunto diversificado de antígenos estranhos, mas incapaz de responder a antígenos próprios.

Assim, existem alguns fatores envolvidos no processo de tolerância central. Primeiramente, deve haver a expressão de um TCR (receptor de célula T) funcional durante o desenvolvimento das células T; posteriormente, a apresentação de antígenos próprios por APCs no timo, e finalmente, fatores e vias que permitam deleção ou apoptose em células auto-reativas (MOUCHESS; ANDERSON, 2013).

A tolerância central assegura que o repertório de linfócitos maduros torne-se incapaz de responder aos antígenos próprios expressos nos órgãos linfoides primários (timo para células T, e a medula óssea para os linfócitos B). A tolerância periférica previne a ativação de linfócitos auto-reativos que tenham escapado da tolerância central.

As células T reguladoras (Treg) são necessárias para supressão das células T auto-reativas na periferia. Tanto a seleção negativa das células T auto-reativas como a seleção das células Treg ocorrem no timo e são processos importantes na tolerância imunológica.

A autoimunidade tem início quando há uma falha nos mecanismos de tolerância própria em células T ou B, levando a um desequilíbrio entre ativação e controle dos linfócitos. Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da autoimunidade são susceptibilidade genética e causas ambientais.

No humano, o diabetes tipo 1 é uma doença crônica, caracterizada pela destruição seletiva das células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas, produtoras de insulina, por linfócitos T auto-reativos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Sua prevalência é inferior a 1%, porém sua incidência varia largamente entre populações e áreas geográficas. As maiores taxas de incidência mundial (superiores a 35/100.000 habitante/ano) ocorrem na Finlândia e Sardenha (Itália), seguidas por populações caucasianas na Europa e América (cerca de 10–20/100.000 habitantes/ano), com incidência moderada da doença. Finalmente, os países asiáticos (Japão, China e Coreia), apresentam as menores taxas mundiais (inferiores a 3/100.000 habitantes/ano). No Brasil, observamos taxas de 7,6 /100.000 habitantes/ano.

Incide igualmente nos sexos masculino e feminino, com picos de incidência na

infância, puberdade e jovens até 25 anos de idade (JAHROMI; EISENBARTH, 2007).

O diabetes tipo 1 acarreta perda permanente da produção de insulina, gerando hiperglicemia e requerendo insulino terapia como tratamento substitutivo contínuo.

Antes do surgimento da hiperglicemia clínica, que promove o diagnóstico da doença na maioria dos casos, existe um período denominado pré-diabetes, que pode ser identificado pela presença de auto-anticorpos contra antígenos da célula β e pela perda progressiva da capacidade secretora de insulina. O antígeno específico da célula β não está ainda definido, mas os auto-anticorpos contra vários componentes da célula β , presentes no sangue de pacientes, são importantes marcadores da progressão da doença (revisado por SILVA *et al.*, 2008).

O diabetes tipo 1 tem determinismo poligênico e multifatorial. Múltiplos genes contribuem para o seu desenvolvimento, sendo descritos mais de 20 *loci* que conferem suscetibilidade, denominados IDDM, estando os mais importantes localizados nos cromossomos 6 e 11 (KANTÁROVÁ, BUC, 2007).

A região do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), localizada no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), situa-se no braço curto do cromossomo 6, e constitui o principal locus de suscetibilidade para diabetes tipo 1, IDDM1 (*loci* DR e DQ são responsáveis por 40% a 50% de risco genético para a doença). O segundo maior locus de susceptibilidade, denominado IDDM2, situa-se no gene da insulina (INS), no cromossomo 11, e contribui com 10% da suscetibilidade genética para a doença.

Vários agentes etiológicos foram apontados como desencadeantes da auto-imunidade. Entre eles temos os vírus Coxsackie e da rubéola, as toxinas (pesticidas, nitratos), o reduzido número de infecções (teoria da higiene), a deficiência na suplementação de vitamina D e alguns alimentos (introdução precoce do leite de vaca ou tardia e abrupta de cereais) (AKERBLOM *et al.*, 2002).

1.5 MODELO EXPERIMENTAL ESPONTÂNEO DE DIABETES TIPO 1: CAMUNDONGO “NON OBESE DIABETIC” (NOD)

O camundongo NOD tornou-se um importante modelo experimental de diabetes autoimune espontâneo devido a diversas similaridades com o diabetes tipo 1 humano. Este modelo experimental tem sido amplamente utilizado e representa uma ferramenta importante por possibilitar o estudo do diabetes autoimune, em múltiplos aspectos, da fisiopatologia à expressão clínica da doença, assim como para direcionar diversos protocolos terapêuticos de imunointervenção.

Foi descoberto no Japão, por MAKINO e colaboradores em 1980, durante a seleção de uma linhagem propensa a catarata, derivada da linhagem consanguínea ICR. A linhagem NOD foi estabelecida através de inúmeros acasalamentos entre irmãos.

As colônias espalhadas pelo mundo diferem quanto à frequência e idade de aparecimento de diabetes, possivelmente como consequência das diferentes condições ambientais de manutenção dos animais. No Brasil, a linhagem NOD foi implantada por PAVIN; ZOLLNER (1994), na UNICAMP. Dados obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP,2009) informavam a frequência de desenvolvimento da doença, na colônia NOD/Uni, de 76,7% nas fêmeas (80% a partir da 23ª semana) e de 23,3% nos machos (aparecimento tardio, a partir da 30ª semana).

O camundongo NOD foi considerado um excelente modelo experimental de diabetes autoimune, em decorrência das seguintes constatações (CARNAUD, 1995):

- a preponderância de células T CD4+ e CD8+ na constituição da insulite pancreática;
- a comprovação da transferência do diabetes tipo 1 de um NOD diabético para um não diabético através de linfócitos T CD4+ e T CD8+.
- a prevenção da doença com a administração de imunossupressores.

O diabetes clínico desenvolve-se de forma similar à doença no homem, precedido por uma fase denominada pré-diabetes, caracterizada pela infiltração progressiva das ilhotas pancreáticas por células linfomononucleares (insulite), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida, nos dois sexos (KIKUTANI; MAKINO, 1992).

A insulite é um infiltrado inflamatório composto por linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas. As células T CD4+ ativadas agem no processo da insulite,

determinando uma resposta inflamatória tipo Th1 e padrão de secreção de citocinas, especialmente interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). A progressão da insulite culmina com a morte das células β pancreáticas. As células T CD4+ também ativam as células T CD8+ e linfócitos B produtores de auto-anticorpos (imunidade humoral) (revisão de ANDERSON; BLUESTONE, 2005).

O camundongo NOD apresenta algumas deficiências no sistema imunológico que podem contribuir para a expressão da autoimunidade, entre elas, defeito na maturação e função dos macrófagos, baixos níveis de células NK (célula natural killer) ativadas, defeitos nas células NKT, deficiência na população de células reguladoras (revisão de ANDERSON; BLUESTONE, 2005).

As células B podem influenciar na susceptibilidade à doença autoimune através da produção de auto-anticorpos ou como células apresentadoras de antígenos (APC) capazes de capturar e apresentar antígenos da ilhota para células T auto-reativas.

As células T CD4+, como demonstrado em experiências de transferência (THIVOLET *et al.*, 1991), são as primeiras a invadirem as ilhotas, havendo migração posterior de células T CD8+. Recentemente, distúrbios funcionais de células T imunoreguladoras foram observados, demonstrando a cooperação entre células do sistema inato, NK, NKT e células T. (DIANA *et al.*, 2011).

As citocinas pró-inflamatórias como IL1, TNF α e INF γ são identificadas nas ilhotas do camundongo NOD e humanos durante a progressão do diabetes. *In vitro*, estas citocinas exercem efeitos citotóxicos sobre a célula β , como produção de radicais livres (óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio) e ativação de vias intracelulares da apoptose (THOMAS *et al.*, 2009).

Entretanto foi observado que IL1 e TNF α têm efeito negativo no desenvolvimento e função das células T regulatórias, uma vez que o bloqueio destas citocinas resulta na redução do diabetes tipo 1 (THOMAS *et al.*, 2012).

YOU e colaboradores (2005) demonstraram que o camundongo NOD idoso exibe perfil acentuado de citocinas Th1, com prevalência de INF γ sobre IL10 e de INF γ sobre IL4 em comparação com NOD jovem. Estes resultados indicam que o acúmulo de células T diabetogênicas ocorrem muito cedo no camundongo NOD, porém não são suficientes

para promover a doença logo no início, destacando o papel das células T reguladoras no controle do diabetes. O início da doença estaria associada com a perda de sensibilidade das células T efectoras à citocina imunorreguladora TGF β .

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este projeto faz parte da REDE NANOBIOTEC CAPES – 2008, com objetivo de estudar o efeito dos nanotubos de carbono (NTC) no sistema imunológico, em diversos modelos experimentais. Esta tese contemplou o estudo dos efeitos da administração sistêmica *in vivo* dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWNTC) no desenvolvimento espontâneo de diabetes do camundongo Non Obese Diabetic (NOD), um modelo experimental de diabetes autoimune. O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia da Profa. Leonilda M. B. Santos, IB-UNICAMP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação das características histológicas da insulite pancreática e do desenvolvimento do diabetes clínico ao longo de 24 semanas após o início do protocolo experimental.
- Análise do perfil de citocinas pró-inflamatórias: IL12, TNF α , INF γ e anti-inflamatórias: IL10, TGF β , previamente analisadas no laboratório em animais expostos a MWNTC.
- Identificação morfológica da presença de MWNTC em alguns órgãos do sistema reticulo-endotelial e no pâncreas.

3.1 ANIMAIS

Camundongos NOD/Uni, fêmeas, de 6 semanas de idade, mantidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP), foram abrigados em condições livres de patógenos. Durante a fase de experimentação, os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, bloco F, do Instituto de Biologia da UNICAMP, também em condições livres de patógenos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração específica para roedores (NUVITAL) durante todo o período. Foram confinados a uma temperatura entre 21° e 23°C e a um ciclo de 12 horas com luz e 12 horas no escuro. Os animais tinham idade adequada para os experimentos e foram randomicamente distribuídos entre os grupos tratados e controles. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as regras e instruções propostas pelo Conselho brasileiro de uso de animais e aprovado pelo Comitê de ética de experimentação animal da universidade (CEUA/UNICAMP 2503-1).

3.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MWNTC

Foi utilizado MWNTC não funcionalizado (HELIX Material Solutions; diâmetro: 10 a 30 nm, comprimento: 0,5 a 40 μm , pureza: >95%). Inicialmente, o MWNTC foi esterilizado em autoclave (Stermax, Brasil), durante 30 minutos à 121° C. Posteriormente, foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) + 0,01% Pluronic F-127 @ (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA), mantendo a concentração de 1mg/ml, com o objetivo de melhorar a dispersão e sonicação por meio de sonificador (Unique, modelo DES 500, Brasil) durante 15 minutos.

Os espectros Raman foram registrados à temperatura ambiente, usando um sistema Renishaw e empregando um laser de argônio ($\lambda = 514.5 \text{ nm}$), com potência de cerca 6 mW. Na espectroscopia (Figura 1A), observou-se a região de primeira ordem, onde foram evidenciados dois picos intensos em 1330 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} , correspondentes ao pico de desordem sp^2 (linha D) e ao pico de grafite altamente orientada E_{2g}sp^2 (linha G).

A caracterização morfológica da preparação de MWNTC foi realizada antes do início do protocolo experimental, por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e as imagens estruturais mostram que as amostras consistem de estruturas tubulares não alinhadas, de múltiplas paredes, com aglomerações emaranhadas que cobrem a superfície do substrato, como mostra a Figura 1 (B e C).

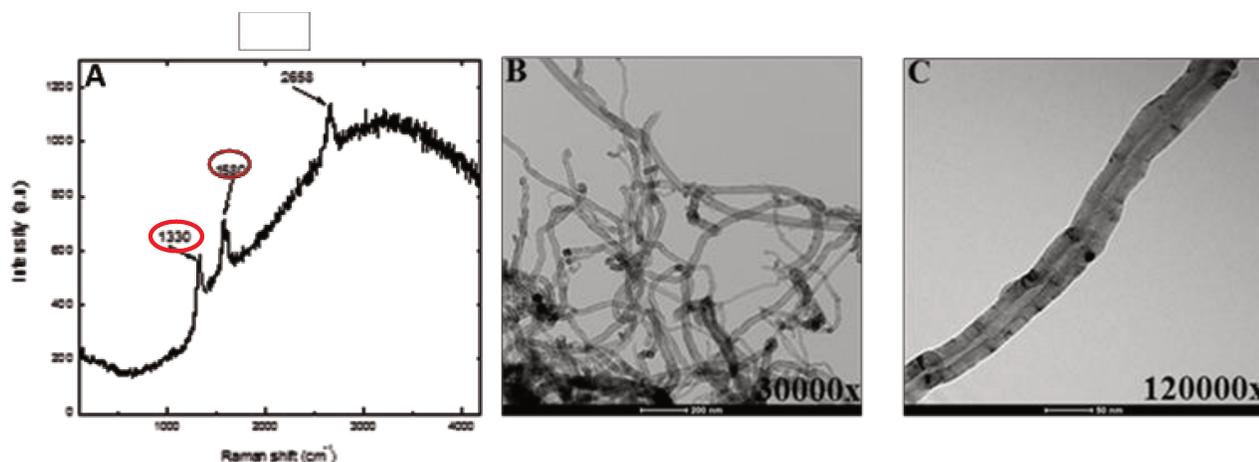


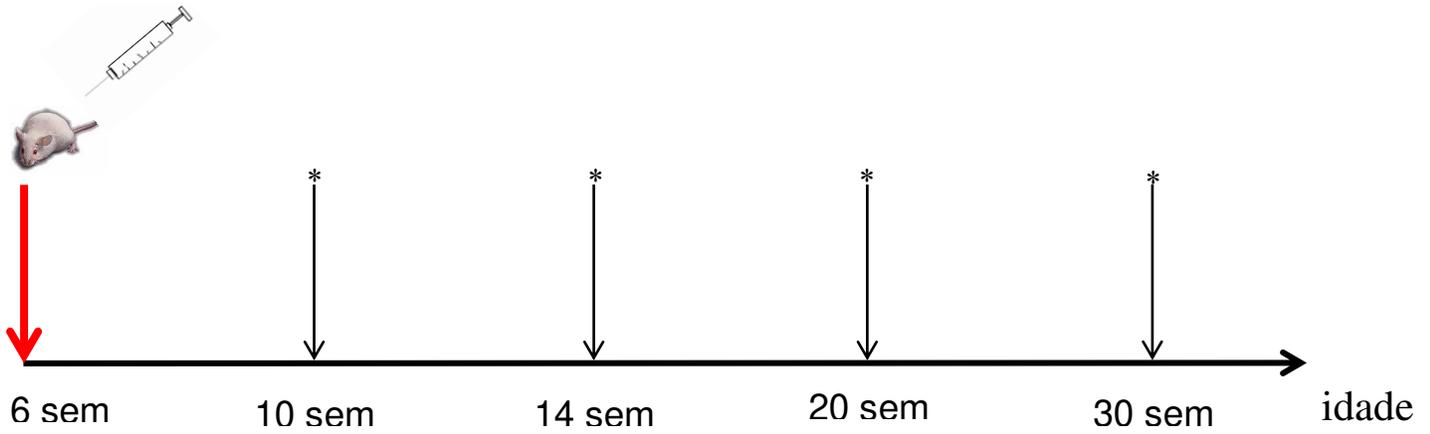
Figura 1: Espectroscopia Raman da preparação de MWNTC (A). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da preparação de MWNTC, em diferentes ampliações, mostrando sua estrutura característica (B, C).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os camundongos NOD fêmeas de 6 semanas de idade foram separados em grupos: 1) tratados com dose única de MWNTC (100µg/animal), injetado por via intraperitoneal (n=46); 2) controles. O grupo controle (n=45) foi subdividido em: 20 animais que receberam igual volume do veículo PBS + 0,01% Pluronic F-127 estéril e 25 animais não injetados. Os resultados do grupo controle foram, entretanto, demonstrados de forma conjunta, por não terem apresentado diferenças.

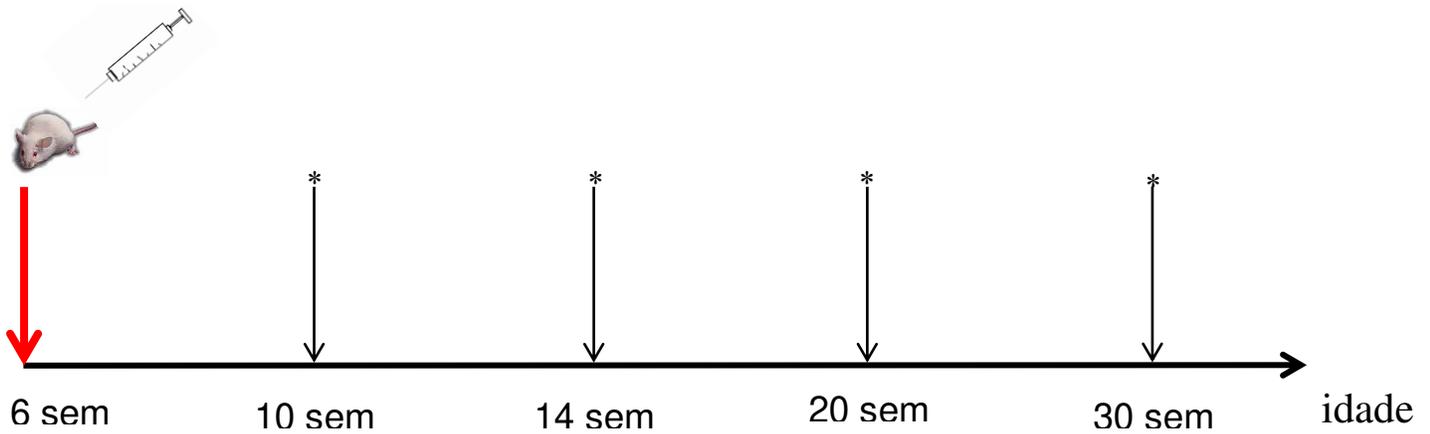
Foi realizado estudo de seguimento longitudinal dos animais, até a 30ª semana de vida, o equivalente a 24 semanas após o início do tratamento, momento de término do experimento.

Grupo Controle (n=45)



Grupo Tratado (n=46)

MWNTC Intraperitoneal (100 µg/animal)



*Tempo de sacrifício dos animais (n=3-5/grupo)

A administração por via intraperitoneal (ip) foi escolhida pelo potencial do MWNTC formar agregados, dificultando a injeção endovenosa, como em experimentos prévios, em nosso laboratório. Além disso, outros autores a consideraram uma via sistêmica, assim como a endovenosa. Segundo YAMAGUCHI e colaboradores (2012), a via de administração ip é sensível o suficiente para detectar os mínimos efeitos do MWNTC, como efeitos carcinogênicos e tem a vantagem de se poder controlar a relação entre a dose de administração e da exposição do agente.

O protocolo para análise morfológica da presença de MWNTC em fígado, baço, pâncreas e gânglio peri-pancreático consistiu de dois períodos: fase aguda, considerando-se os tempos para sacrifício de animais: 24h e 7 dias após início do tratamento; fase de longo prazo, considerando-se os tempos: 8, 14 e 24 semanas após início do tratamento.

A análise histológica de pâncreas para avaliação de insulite e as dosagens de citocinas em linfonodo peri-pancreático foram determinadas, em grupos tratado e controle, nos tempos: 14^a, 20^a e 30^a semanas de vida dos animais (n=3-5 animais/grupo/tempo estudado), representando 8, 14 e 24 semanas após início do tratamento.

Os animais foram sacrificados com 60 a 80 mg/kg do anestésico Ketamina (Vetanarcol®) + 8 a 15mg/Kg do anestésico Xilazina (Sedomin®), realizando-se extração de sangue por meio de punção cardíaca com agulha de insulina.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DO DIABETES CLÍNICO

A flutuação de glicemia dos animais foi analisada, semanalmente, por monitorização glicêmica, através de medidas casuais de sangue, coletadas em veia da cauda e mensuradas em glicosímetros (Accu-Chek Performa, Roche, EUA e One-Touch, Jonhson, EUA). Para o diagnóstico do diabetes clínico, foi adotado o valor de glicemia ≥ 200 mg/dL, em duas medidas consecutivas.

3.5 EXTRAÇÃO DOS LINFONODOS PERI-PANCREÁTICOS

Os linfonodos peri-pancreáticos foram extraídos manualmente dos animais sacrificados, após serem identificados visualmente, aderidos ao pâncreas. Os pâncreas com um dos linfonodos peri-pancreáticos foram acondicionados individualmente em cápsulas próprias com meio Tissue-Tek (Sakura, USA), rapidamente crio-congelados e conservados à -80°C para análise histológica. Outros órgãos, como fígado, baço e linfonodos mesentéricos foram também crio-congelados.

Os linfonodos peri-pancreáticos foram macerados com solução balanceada de Hank's (Sigma-Aldrich, USA) e centrifugados. O pellet foi ressuspenso em Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e congelado à -80°C para extração do mRNA.

A confirmação laboratorial dos linfonodos peri-pancreáticos de animais NOD extraídos após sacrifício, foi feita no início dos experimentos, em grupos controle e tratado, por citometria de fluxo (Figura 2) para quantificar os subconjuntos diferentes de linfócitos T. Utilizou-se anticorpo anti-CD4 PerCP (BD Biosciences, USA) e anticorpo anti-CD8 APC (BD Biosciences, USA). A aquisição foi feita em citômetro de fluxo Gallios® (BECKMAN COULTER). As análises foram feitas usando software KALUZA®.

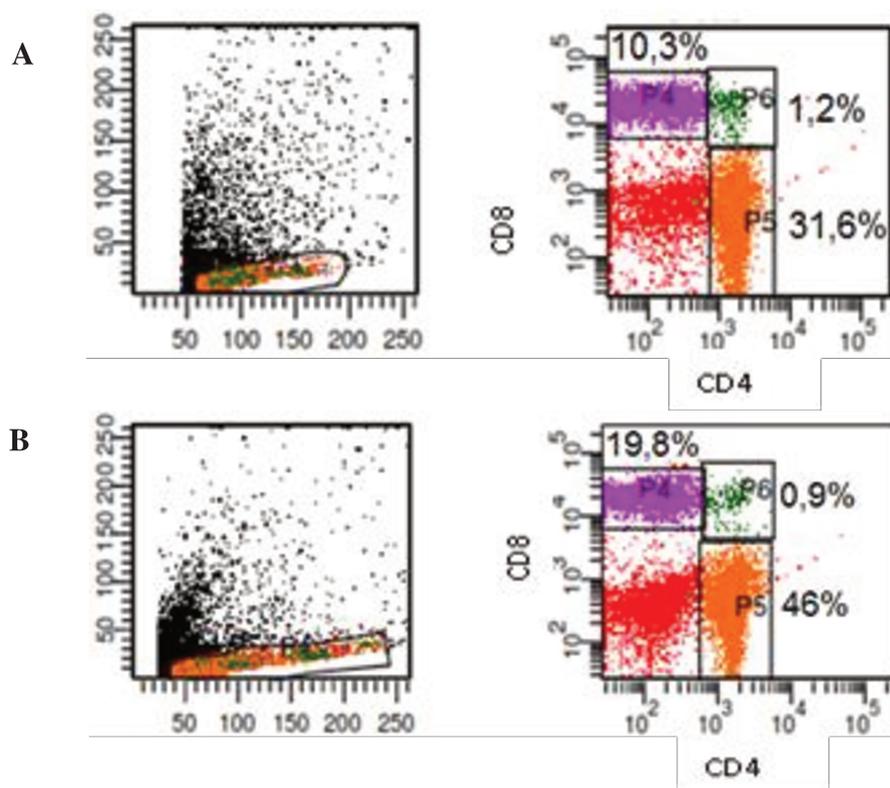


Figura 2: Citometria de linfonodos peri-pancreáticos de animais NOD controle (A) e NOD tratado (B).

3.6 REAL TIME PCR

O mRNA extraído de todas as amostras de linfonodo peri-pancreático foi convertido em cDNA usando-se o kit de conversão *High Capacity cDNA* (APPLIED BIOSYSTEMS), de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram colocados junto a conjuntos de primers e sonda marcada com FAM-MGB (IL-10, TGF- β , IL-12, IFN γ , TNF α) e *master mix* (APPLIED BIOSYSTEMS). As análises foram feitas usando *Real-time PCR system 7500 fast* (APPLIED BIOSYSTEMS). Os ciclos e as temperaturas, já determinadas pelo fabricante, são os seguintes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C/1 minuto a 60°C.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nos pâncreas extraídos e congelados em Tissue-Tek, foram realizados cortes seriados de 5 μ m de espessura em criostato (Leica CM 1850, Germany), à -23°C e

recuperados em lâminas. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, USA) para a avaliação da insulite, por meio de microscopia ótica.

O estadiamento da insulite, caracterizado nos cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina em microscopia ótica, está demonstrado na Figura 3. O infiltrado linfomononuclear foi classificado segundo uma série de cinco graus: G0 = ausência de infiltrado; G1 = peri-insulite; G2 = insulite invasiva com < 80% da ilhota invadida; G3 = insulite invasiva com > 80% da ilhota invadida; G4 = insulite invasivo-destrutiva e G5 = pós invasão com ilhotas pancreáticas atróficas e desaparecimento do infiltrado. As ilhotas foram contadas e classificadas por grau, em duplo cego, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados foram expressos como a média do número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, observadas em três a cinco camundongos, para cada grupo experimental.

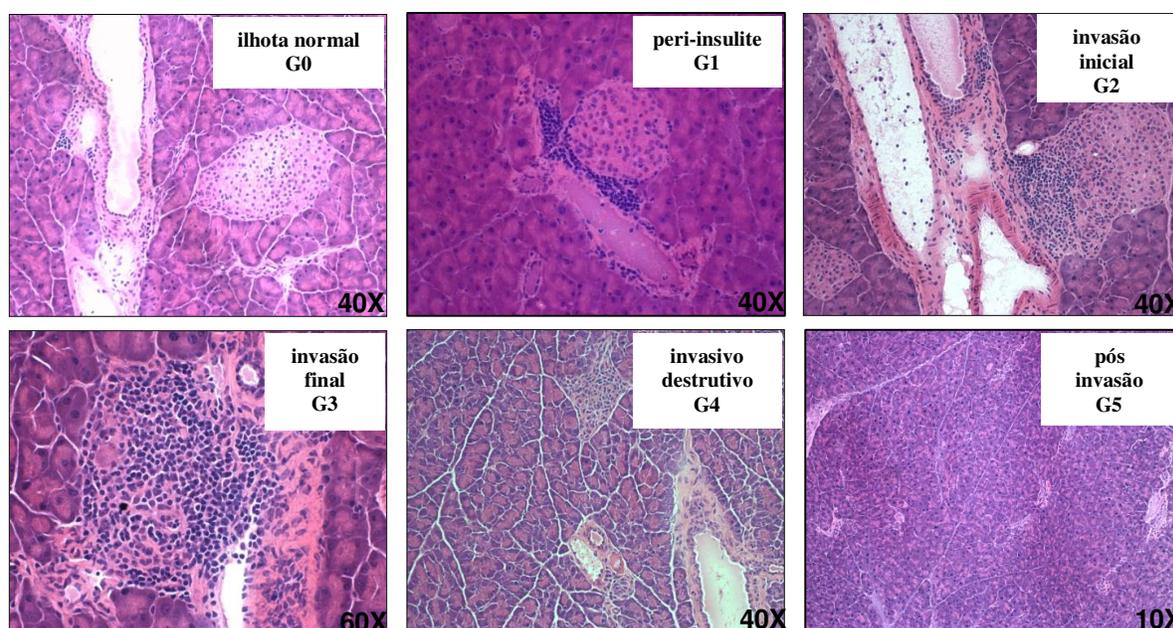


Figura 3: Classificação histológica do infiltrado linfomononuclear em lâminas de pâncreas de animais NOD, coradas com hematoxilina-eosina, microscopia ótica.

A mesma técnica de análise histológica foi aplicada aos demais órgãos: fígado, baço e linfonodos.

3.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Esta análise ultraestrutural foi realizada, utilizando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), em camundongos NOD controle e tratado, de 14 semanas de idade (8 semanas após início do protocolo experimental), segundo técnica previamente descrita (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

Após anestesia com 50mg/kg Ketamina (Fort Dodge,) e 10mg/kg Xilazina (Körnig), os animais foram previamente perfundidos com NaCl 0,9% heparinizado, injetado no ventrículo esquerdo, com auxílio de uma bomba de infusão, para se evitar a coagulação sanguínea. Em seguida, foram perfundidos e fixados com 20ml de 2% glutaraldeído e 1% paraformaldeído em 100mM de tampão fosfato, pH 7,3, para a realização da toracotomia.

Os linfonodos peri-pancreáticos e pâncreas foram dissecados e pós-fixados com 1% de tetróxido de ósmio, desidratados em série crescente de álcool e incluídos em resina Durcupan (Fluka, Steinheim, Suíça). Secções ultrafinas dos órgãos foram coletados, colocados em formvar (grelhas de cobre revestidas), e coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo para análise em um microscópio Tecnai G² Biotwin Spirit (FEI Company, Holanda), a 120kV e imagens digitais são coletadas com Eagle 2K câmara de vídeo e software de gráficos vetoriais (FEI Company, Holanda).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística foi determinada através de testes não paramétricos. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Exato de Fisher e Wilcoxon. O valor de p menor que 0.05 foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0.

RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO DA FLUTUAÇÃO GLICÊMICA DOS CAMUNDONGOS NOD

As fêmeas NOD/Uni de 6 semanas de idade, grupo controle e grupo tratado com injeção única intraperitoneal (ip), de 100 µg de MWNTC, tiveram a glicemia monitorizada semanalmente, durante 24 semanas, até a 30ª semana de vida.

O descenso do número de animais em seguimento deveu-se ao sacrifício programado no protocolo experimental deste estudo. Não houve letalidade após administração de MWNTC. A mortalidade ocorrida em ambos os grupos experimentais foi decorrente da hiperglicemia grave e mantida, sem tratamento, no caso dos animais com diabetes, em torno de 2 meses após o diagnóstico.

O grupo tratado com MWNTC apresentou flutuação média de glicemia significativamente maior em relação ao grupo controle até o final do estudo ($p < 0,0001$, Wilcoxon), como descrito na Figura 4. Esta elevação glicêmica se iniciou a partir da 10ª semana de vida, momento que coincide com início de infiltrado invasivo em ilhotas pancreáticas. Após a 14ª semana de vida, ambos os grupos apresentaram aumento progressivo da glicemia, evoluindo os animais tratados com MWNTC com médias glicêmicas sempre superiores aos controles. Os valores das médias de glicemia em diferentes tempos do estudo estão citados na Tabela 1.

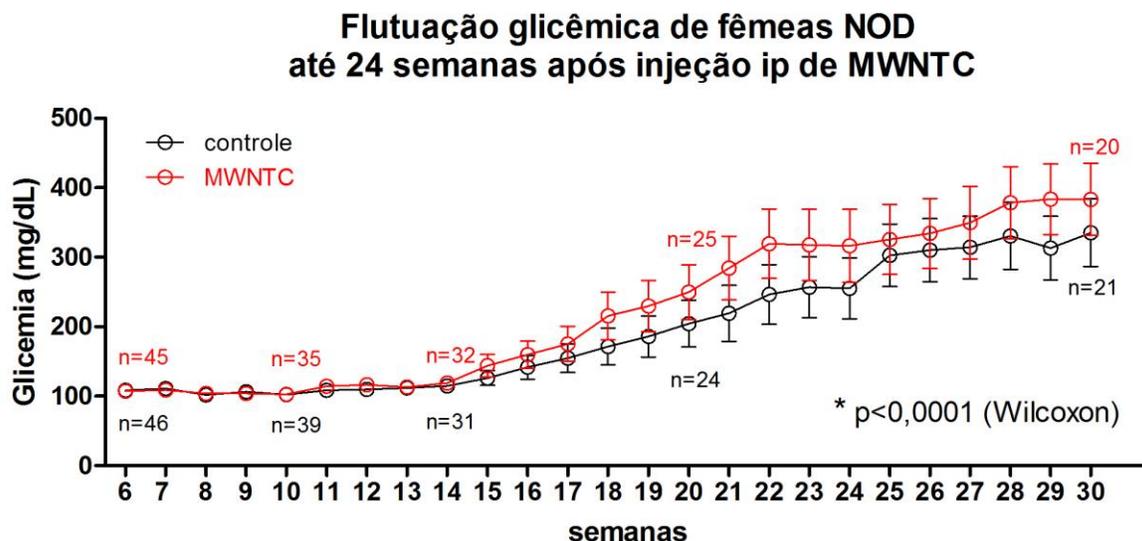


Figura 4: Gráfico de evolução da flutuação de glicemias de fêmeas NOD. Observam-se as médias de glicemias semanais dos grupos controle e tratado com injeção única de MWNTC, durante as 24 semanas após início do protocolo experimental.

Idade (semanas)	Glicemia (mg/dL) de fêmeas NOD	
	Controle	MWNTC
6	108,6 ± 15,8	107,3 ± 14,4
10	102,1 ± 12,9	102,6 ± 12,1
14	115,0 ± 15,3	119,0 ± 27,5
20	204,6 ± 162,7	249,8 ± 195,1
30	335,4 ± 222,1	361,1 ± 230,0

Tabela 1: Valores de glicemia (mg/dL) de fêmeas NOD/Uni, relatados como média ± DP em diferentes tempos do estudo.

4.2 APARECIMENTO DO DIABETES CLÍNICO

Na Figura 5, está representada a incidência cumulativa de aparecimento do diabetes clínico, diagnosticado por hiperglicemia mantida acima de 200 mg/dL, em grupos controle e tratado com MWNTC.

No grupo controle, 10/21 animais (47,6%) desenvolveram o diabetes clínico espontâneo, com a seguinte sequência de idade ao diagnóstico: 15 semanas (n=1), 16 semanas (n=1), 18 semanas (n=1), 19 semanas (n=2), 23 semanas (n=2), 25 semanas (n=3).

A colônia NOD/Uni apresentou-se com incidência de desenvolvimento de diabetes espontâneo menor que a esperada, sendo esta uma modificação atual do perfil desta colônia.

Foi observado o desenvolvimento espontâneo do diabetes clínico em 11/20 animais tratados com MWNTC (55%), com a seguinte sequência de idade ao diagnóstico: 14 semanas (n=1), 15 semanas (n=2), 16 semanas (n=2), 18 semanas (n=2), 21 semanas (n=1), 25 semanas (n=1), 26 semanas (n=1) e 28 semanas (n=1).

Apesar de não ter havido diferenças entre os grupos na frequência de desenvolvimento do diabetes clínico, foi notada uma tendência à antecipação do diagnóstico nos animais tratados com MWNTC. Até a 18ª semana de vida, 63,6% dos NOD tratados já haviam desenvolvido diabetes vs. 30% dos controles ($p < 0,06$, Fisher).

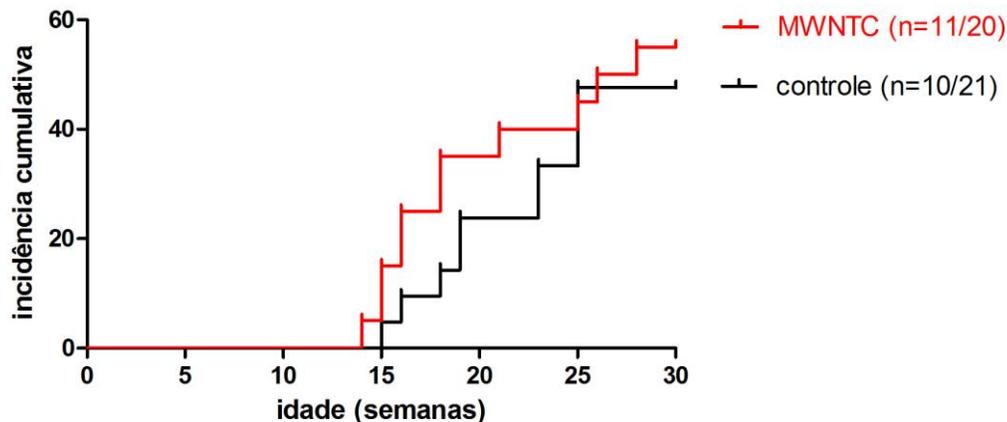


Figura 5: Gráfico de incidência do diabetes clínico em fêmeas NOD/Uni, grupos controle e tratado com MWNTC, até a 30ª semana de vida.

A injeção de MWNTC em fêmeas NOD/Uni, não causou morte direta ou formação tumoral aparente. As mortes ocorreram em animais diabéticos por hiperglicemia grave não tratada; NOD tratados tiveram uma média de sobrevida após o diagnóstico da doença de 7 semanas, menor que a de NOD controles, de 9 semanas.

4.3 EVOLUÇÃO DA INSULITE

A Figura 6 representa o desenvolvimento e progressão da insulite em fêmeas NOD, grupos controle e tratado com MWNTC, através de análise histológica de pâncreas (Hematoxilina-eosina).

Como descrito na literatura, a caracterizada insulite da colônia NOD/Uni precede o aparecimento do diabetes clínico (PAVIN; ZOLLNER, 1994). Há uma invasão progressiva e heterogênea das ilhotas de Langerhans por infiltrado linfomononuclear, de acordo com a idade do animal. Os estágios iniciais de invasão das ilhotas observados na 10ª semana de vida progredem e um infiltrado invasivo-destrutivo das ilhotas ocorre a partir da 14ª semana, sendo majoritário em idades avançadas.

A análise histológica evolutiva de insulite demonstrou que o grupo tratado com MWNTC apresentou características similares ao grupo controle, em todos os tempos estudados. Na 14ª semana de vida, fêmeas NOD controle apresentaram um grau maior

de infiltrado invasivo grave ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Entretanto, neste momento, começa a incidência de diabetes no grupo tratado com MWNTC e ilhotas pancreáticas atróficas com desaparecimento do infiltrado começam a ser detectadas (G5).

Fêmeas NOD de 20 semanas, controles e tratadas com MWNTC, apresentavam achados histológicos compatíveis com as fases terminais de destruição das ilhotas, que estavam de tamanho e número reduzidos ou mesmo atrofiadas, com tendência ao desaparecimento do infiltrado inflamatório. Estes achados são compatíveis com o aparecimento do diabetes clínico.

Com 30 semanas de idade, encontravam-se animais que não haviam desenvolvido diabetes clínico e, por isso, um infiltrado intra-insular menos intenso pode ser ainda observado.

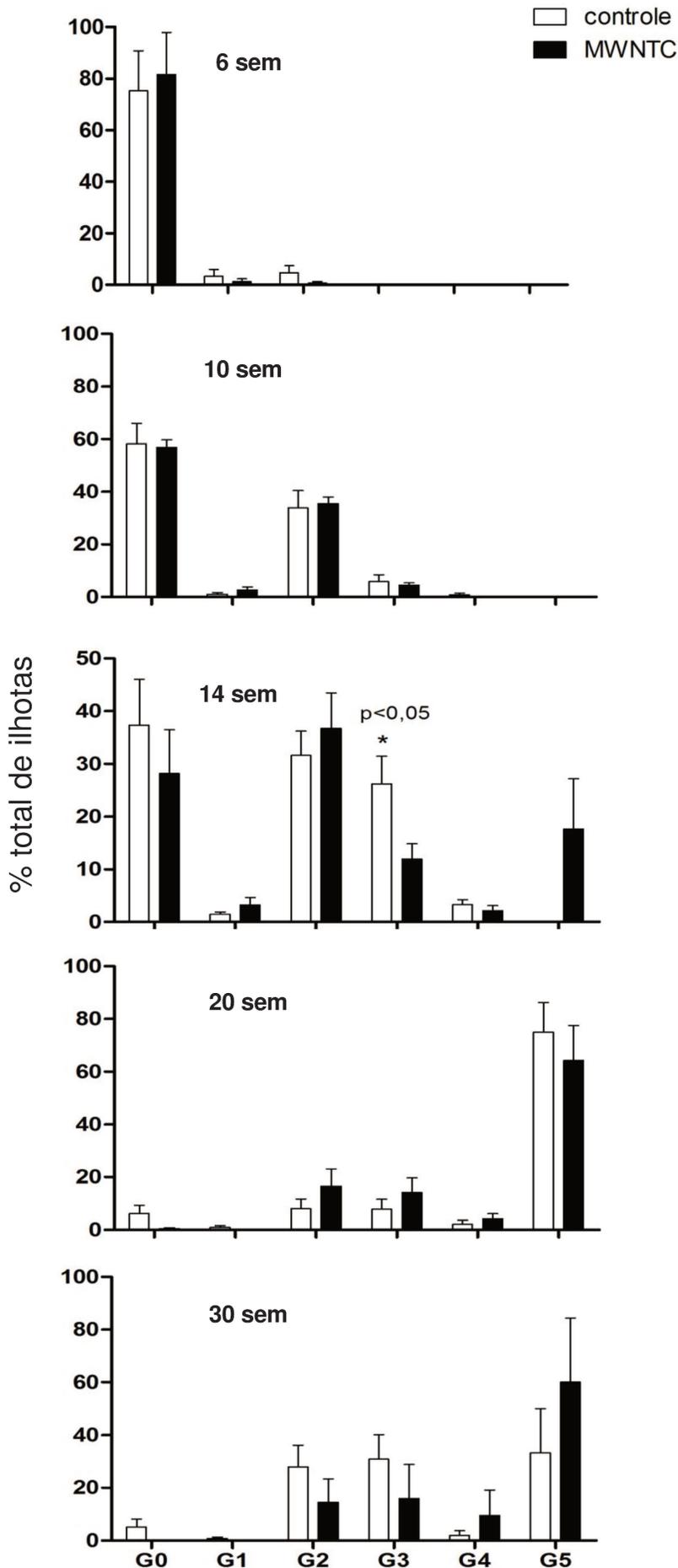


Figura 6: Gráfico evolutivo de desenvolvimento da insulite (histologia de pâncreas por hematoxilina-eosina) em fêmeas NOD/Uni controles e tratadas com MWNTC. Os resultados são expressos como a média do número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, observadas em três a cinco camundongos, para cada grupo experimental. O número de ilhotas (media \pm DP) examinadas por animal (salvo diabético) foi de $43,5 \pm 3,3$ e $36,9 \pm 2,7$, nos grupos controle e tratado, respectivamente. Graduação da insulite: G0: ilhotas normais; G1: peri-insulite; G2: infiltrado invasivo inicial; G3: infiltrado invasivo final (>80%); G4: infiltrado invasivo-destrutivo; G5: ilhota destruída.

4.4 EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Neste protocolo experimental, estudou-se a expressão evolutiva de mRNA de um perfil de citocinas pró-inflamatórias: IL12, TNF α , INF γ e anti-inflamatórias: IL10, TGF β , previamente analisadas no laboratório em animais expostos a MWNTC (GRECCO *et al.*, 2011).

Concomitantemente, o desenvolvimento do diabetes no camundongo NOD está associado com uma resposta imune mediada por células, inflamatória e citotóxica, ativada por citocinas de fenótipo Th1. Células dos linfonodos regionais peri-pancreáticos foram então escolhidas para mensurar a expressão das citocinas por representarem um sítio de ativação e expansão de linfócitos T reativos anti células β pancreáticas.

Diferenças significativas na expressão de mRNA de citocinas em células de linfonodos peri-pancreáticos foram detectadas tardiamente nos animais NOD tratados com uma única injeção de MWNTC, em comparação com os controles (Figura 7). Um aumento da expressão dos níveis de INF γ ($p < 0,01$, Mann-Whitney) ocorreu em animais de 20 semanas de idade, 14 semanas após o tratamento com MWNTC. INF γ é uma citocina pró-inflamatória chave, envolvida no processo do diabetes autoimune. Na idade de 20 semanas, estas fêmeas NOD apresentavam insulite extensa, com infiltrado invasivo e destruição de ilhotas (Figura 6).

Por outro lado, observou-se redução da expressão de TGF β ($p < 0,01$, Mann-Whitney) em animais de 30 semanas de idade, 24 semanas após o tratamento com MWNTC.

A expressão de TNF α em fêmeas NOD tratadas com MWNTC foi menor nas idades de 14 e 20 semanas, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Entretanto, o estudo evolutivo da expressão de TNF α mostrou um aumento significativo desta citocina, dependente da idade dos animais, em relação à 10^a semana de vida, em ambos os grupos. Enquanto no grupo controle o aumento foi observado nos animais de 20 semanas de idade ($p < 0,02$, Mann-Whitney), este é mais tardio no grupo tratado, ocorrendo em animais de 30 semanas, ($p < 0,04$, Mann-Whitney).

Se analisarmos a relação da expressão média de citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias, evidenciou-se intensa proporção de pró-inflamatórias

nos animais tratados com MWNTC, comparando-se ao grupo controle (Tabela 2). Entre a 14^a e a 20^a semanas de vida, momento onde ocorre progressão da insulite em fêmeas NOD, o tratamento com MWNTC promoveu forte incremento da relação $INF\gamma/TGF\beta$ e $INF\gamma/IL10$ em 32,9 X e 126,4 X, respectivamente. Na 30^a semana de vida, a proporção de expressão de $INF\gamma$ mantinha-se maior em NOD tratados em comparação aos controles e incrementos de similar magnitude foram também encontrados na relação $TNF\alpha/TGF\beta$ e $TNF\alpha/IL10$, aumentados em 10,5 X e 6,7 X, respectivamente.

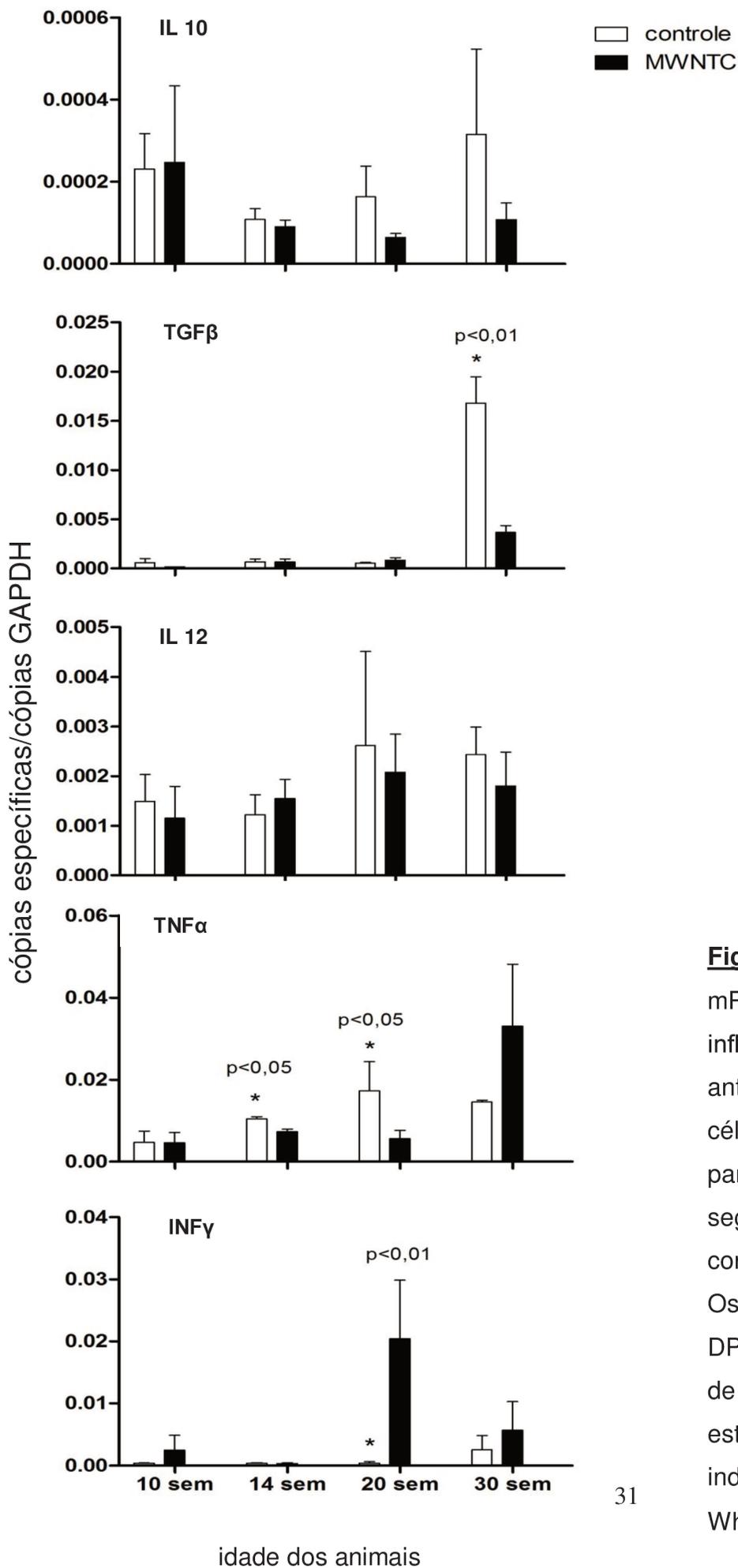


Figura 7: Níveis de expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL12, INFγ e TNFα) e anti-inflamatórias (IL10 e TGFβ) em células de linfonodos peripancreáticos, no decorrer do seguimento dos animais NOD/Uni controles e tratados com MWNTC. Os dados representam as médias ± DP de 3 a 4 animais/grupo/tempo de estudo; as diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas por *p<0,05 (Mann-Whitney).

	10 sem.		14 sem.		20 sem.		30 sem.	
	CT	MWNTC	CT	MWNTC	CT	MWNTC	CT	MWNTC
INFγ/TGFβ	0,70	13,21	0,57	0,54	0,74	24,38	0,15	1,55
INFγ/IL10	1,77	9,87	3,63	3,87	2,52	318,47	8,14	52,67
TNFα/TGFβ	8,10	24,86	15,20	11,25	31,06	6,70	0,86	9,05
TNFα/IL10	20,48	18,59	96,30	80,94	105,58	87,51	46,03	306,96

Tabela 2: Relação da expressão média de citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias dependentes da idade de seguimento de fêmeas NOD/Uni controles e tratadas com MWNTC.

4.5 PRESENÇA DE MWNTC - HISTOLOGIA

4.5.1 Aspectos Macroscópicos

No momento do sacrifício, foram identificados visivelmente depósitos de MWNTC, como material escuro e denso, tanto no fígado como em linfonodos peri-pancreáticos de animais tratados, ao longo de todo o período de estudo. A fotografia da Figura 8 exemplifica estes achados, 8 semanas após a administração de MWNTC.

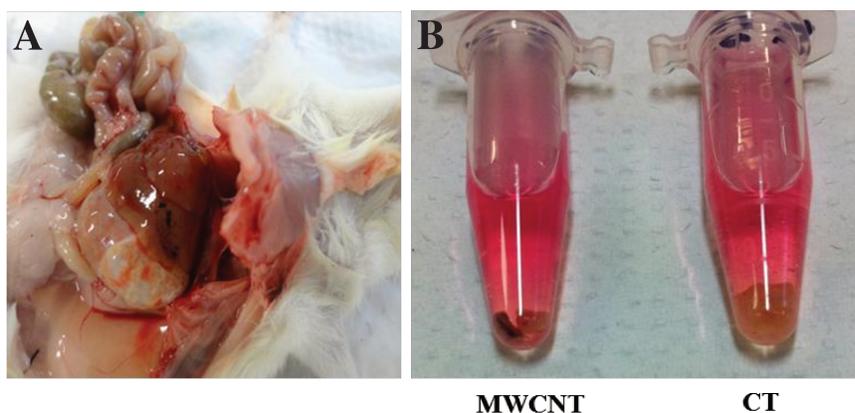


Figura 8: Deposição de MWNTC no fígado de animal NOD tratado (A). Linfonodos peri-pancreáticos de animal tratado e controle, 8 semanas após administração de MWNTC (B).

4.5.2 Aspectos Microscópicos

O estudo histológico para detecção da presença tissular de nanomaterial foi dividido em dois períodos após administração de MWNTC: fase aguda (até 1 semana) e fase a longo prazo (até 24 semanas). Fígado, baço, pâncreas e linfonodos peri-pancreáticos foram analisados.

4.5.2.1 Fase Aguda

A fase aguda compreendeu a análise dos órgãos 24h e 7 dias após a administração via ip de MWNTC, em dose única. Visto como material denso e negro, por exame histológico, coloração hematoxilina-eosina (HE), MWNTC foi observado no fígado, pâncreas e linfonodos peri-pancreáticos de camundongos tratados.

No fígado, um extenso infiltrado inflamatório leucocitário foi desencadeado ao redor dos agregados de MWNTC, logo após sua administração, tal como evidenciado na Figura 9 (A-E). Uma reação inflamatória intensa foi detectada na superfície do fígado, havendo ruptura da membrana hepática e degeneração de hepatócitos (A-B). No interior do órgão, células de Kupffer continham acúmulos de MWNTC (C). Sete dias após a injeção, o MWNTC foi detectado dentro do citoplasma de macrófagos e histiócitos, nas áreas próximas à superfície hepática (D-E).

O acúmulo de MWNTC também foi observado rapidamente, 24h após sua administração, em linfonodos peri-pancreáticos e na parede de ductos pancreáticos (Figuras 10 e 11, respectivamente), mantendo-se, 7 dias após a injeção. Nos linfonodos, MWNTC foi detectado no conteúdo citoplasmático de células fagocitárias, de forma similar aos achados do fígado.

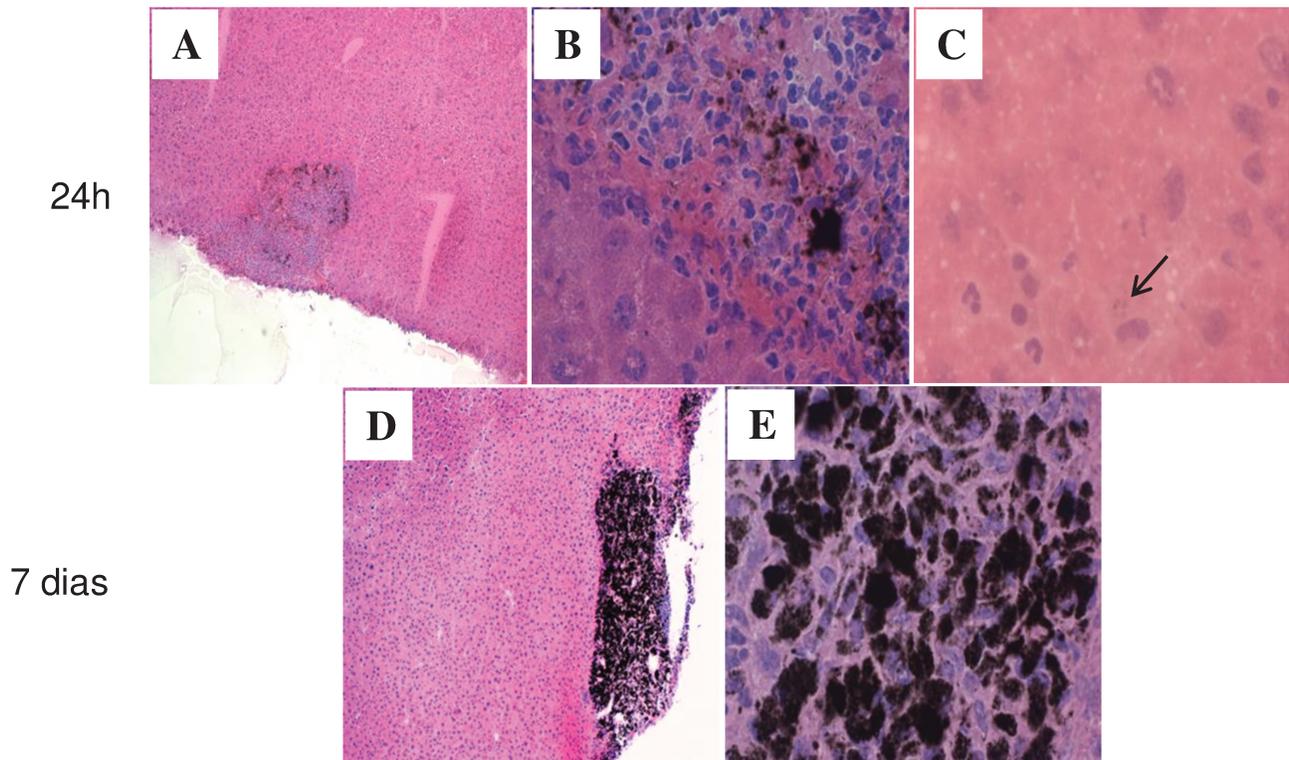


Figura 9: Cortes histológicas (HE) de **fígado** de camundongos NOD 24h (A-C), 7 dias (D-E) após administração ip de MWNTC. Ampliação: x10 (A,D); x100 (B,C,E).

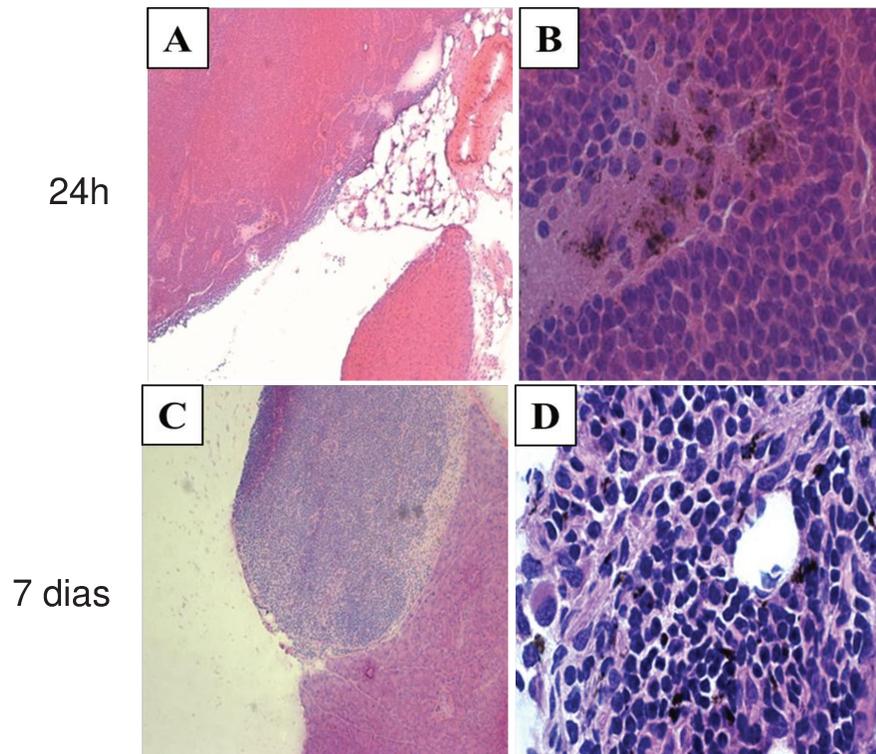


Figura 10: Cortes histológicas (HE) de **linfonodos peri-pancreáticos** de camundongos NOD 24h (A-B) e 7 dias (C-D) após administração ip de MWNTC. Ampliação: x10 (A,C); x100 (B,D).

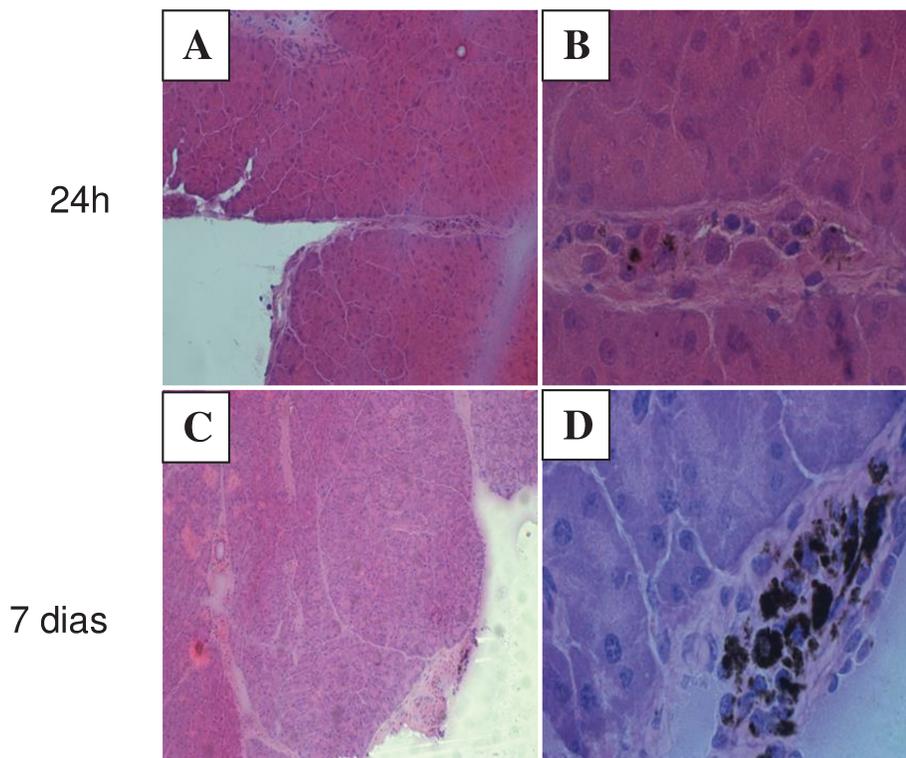


Figura 11: Cortes histológicos (HE) de **ductos pancreáticos** de camundongos NOD 24h (A-B) e 7 dias (C-D) após administração ip de MWNTC. Ampliação: x10 (A,C); x100 (B,D).

4.5.2.2 Fase a Longo Prazo

Dados histológicos relativos ao estudo de fase a longo prazo (até 6 meses após administração do MWNTC) mostraram a clara visualização do nanotubo em fígado, baço, pâncreas e linfonodos peri-pancreáticos de camundongos NOD tratados.

Durante todo o período de acompanhamento dos animais foi observada a presença do MWNTC nos linfonodos peri-pancreáticos e ductos pancreáticos. As imagens de microscopia ótica de animais tratados com 14, 20 e 30 semanas de idade, representando 8, 14 e 24 semanas após a injeção, respectivamente, estão nas figuras 12 e 13.

Linfonodo peri-pancreático

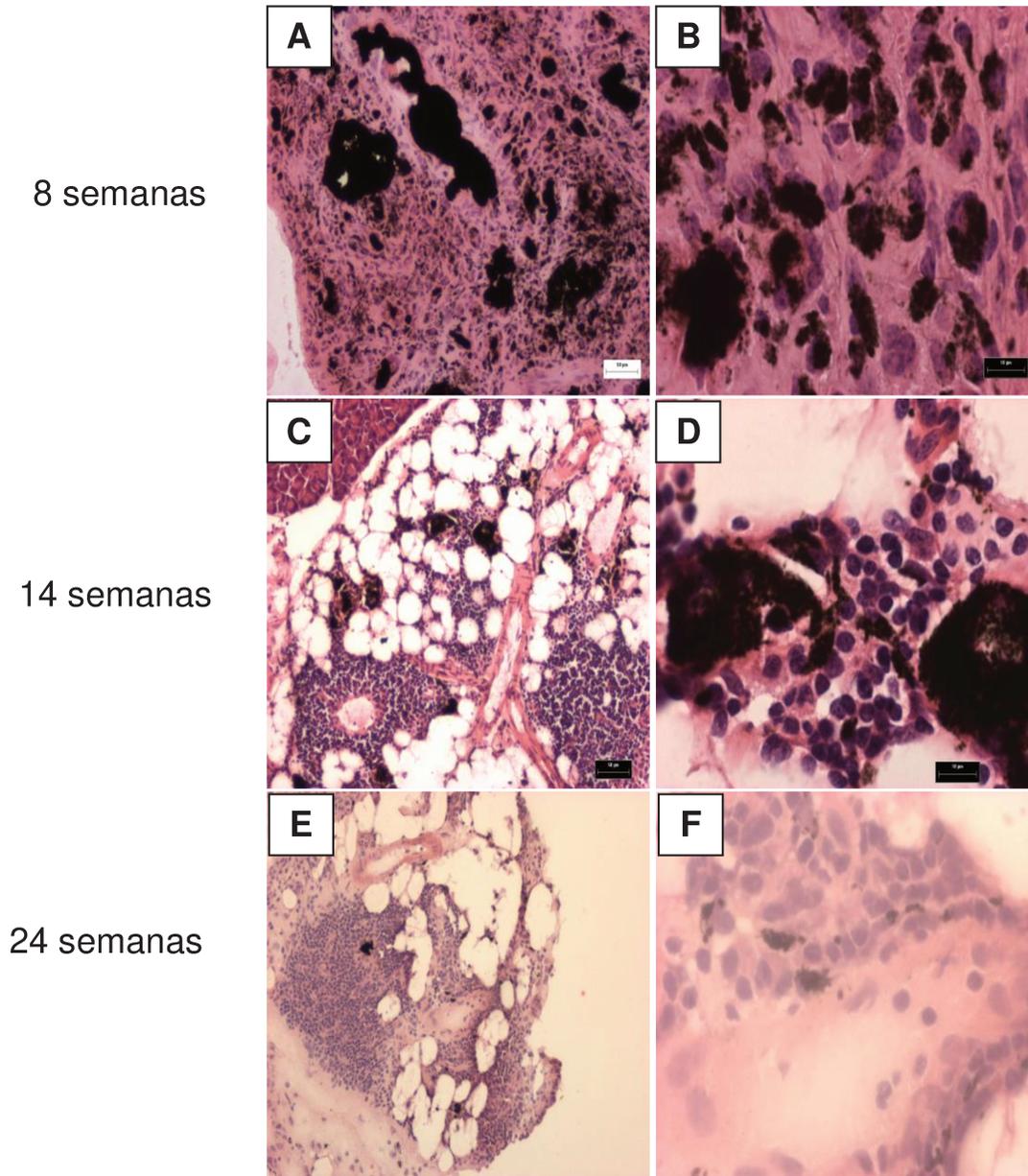


Figura 12: Cortes histológicos (HE) de linfonodos peri-pancreáticos de camundongos NOD 8 (A-B), 14 (C-D) e 24 semanas (E-F) após administração ip de MWNTC. Ampliação: x10 (A,C,E); x60 (B,D); x100 (F).

Ducto pancreático

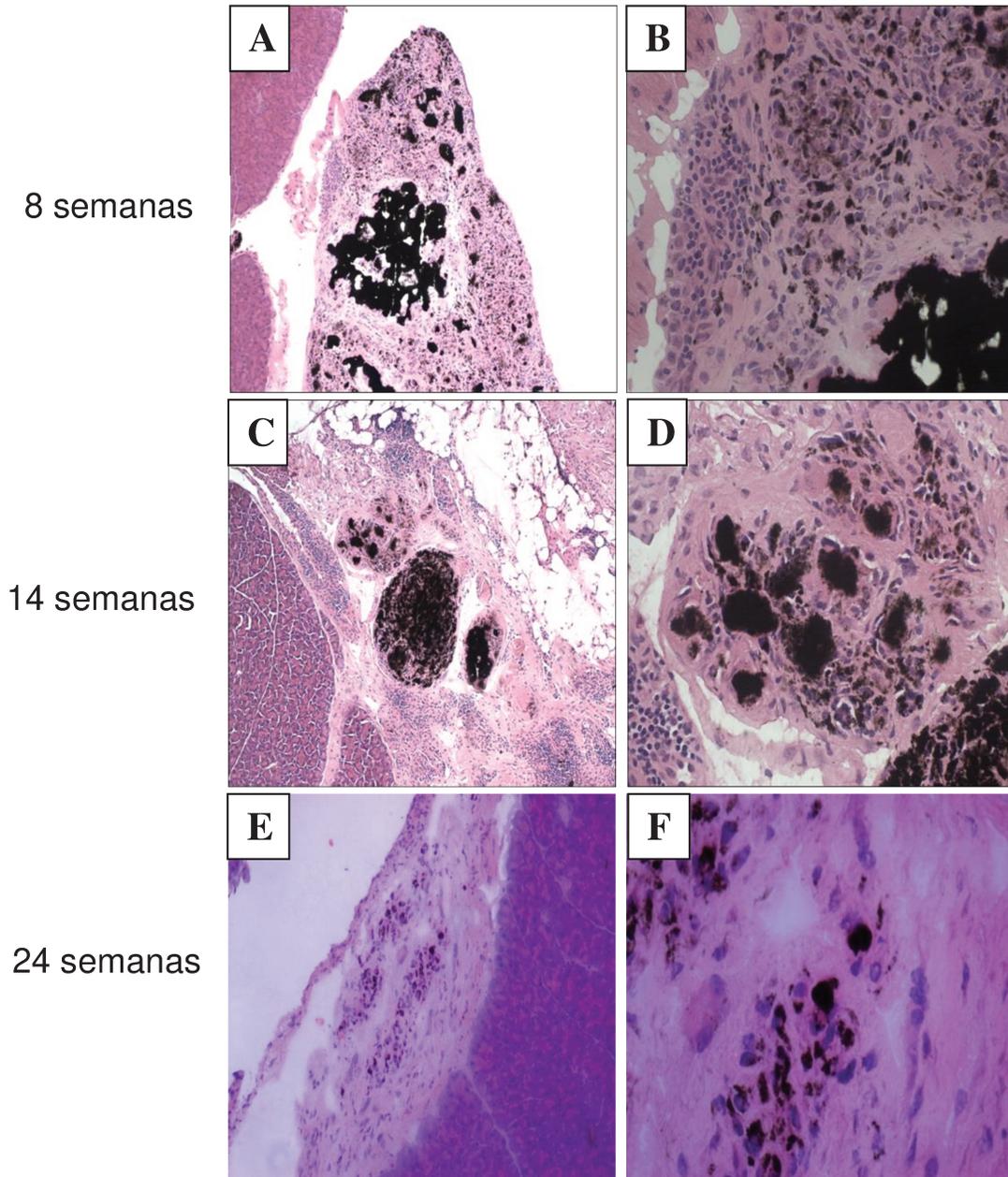


Figura 13: Cortes histológicos (HE) de ductos pancreáticos de camundongos NOD 8 (A-B), 14 (C-D) e 24 semanas (E-F) após administração ip de MWNTC. Ampliação: x10 (A,C,E); x40 (B,D,F).

Nos linfonodos, quantidades variáveis do MWNTC foram encontradas dentro do conteúdo citoplasmático de células fagocitárias, provavelmente dendríticas, ou reticulares, ou mesmo grandes histiócitos (Figura 12).

Nos ductos pancreáticos, grandes acúmulos de nanotubo foram detectados em suas paredes. Nítidas imagens do denso material aparecem em ductos dos vários lobos do pâncreas, nos septos interlobulares, vindo a desembocar nos grandes ductos (Figura 13). Seis meses após a injeção, observaram-se imagens aparentando menores concentrações de MWNTC nos animais de 30 semanas de idade. Nenhuma alteração foi constatada na área exócrina do pâncreas.

No fígado, mesmo 24 semanas após a injeção, a resposta inflamatória persistiu. Apesar do processo de resolução aparente, foi localizado um infiltrado linfomononuclear próximo a borda hepática e presença de MWNTC em células fagocitárias, assim como no interior do órgão, como consta na Figura 14.

No baço, após 24 semanas da injeção, observa-se a presença de MWNTC no conteúdo citoplasmático das células fagocitárias e áreas de fibrose, indicando comprometimento da arquitetura do órgão. Ao redor do órgão nota-se um acúmulo de infiltrado linfomononuclear, como mostra a Figura 14 (D).

A detecção de MWNTC, tanto em linfonodos peri-pancreáticos quanto em ductos pancreáticos foi confirmada pela microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). A figura 15 mostra um linfonodo peri-pancreático de camundongo NOD, de 14 semanas de idade, 8 semanas após tratamento. O MWNTC, com sua imagem estrutural característica, foi encontrado em fagolisossomos de células com características de macrófagos. A presença de grandes concentrações de MWNTC foi identificada nas células epiteliais dos ductos (Figura 16).

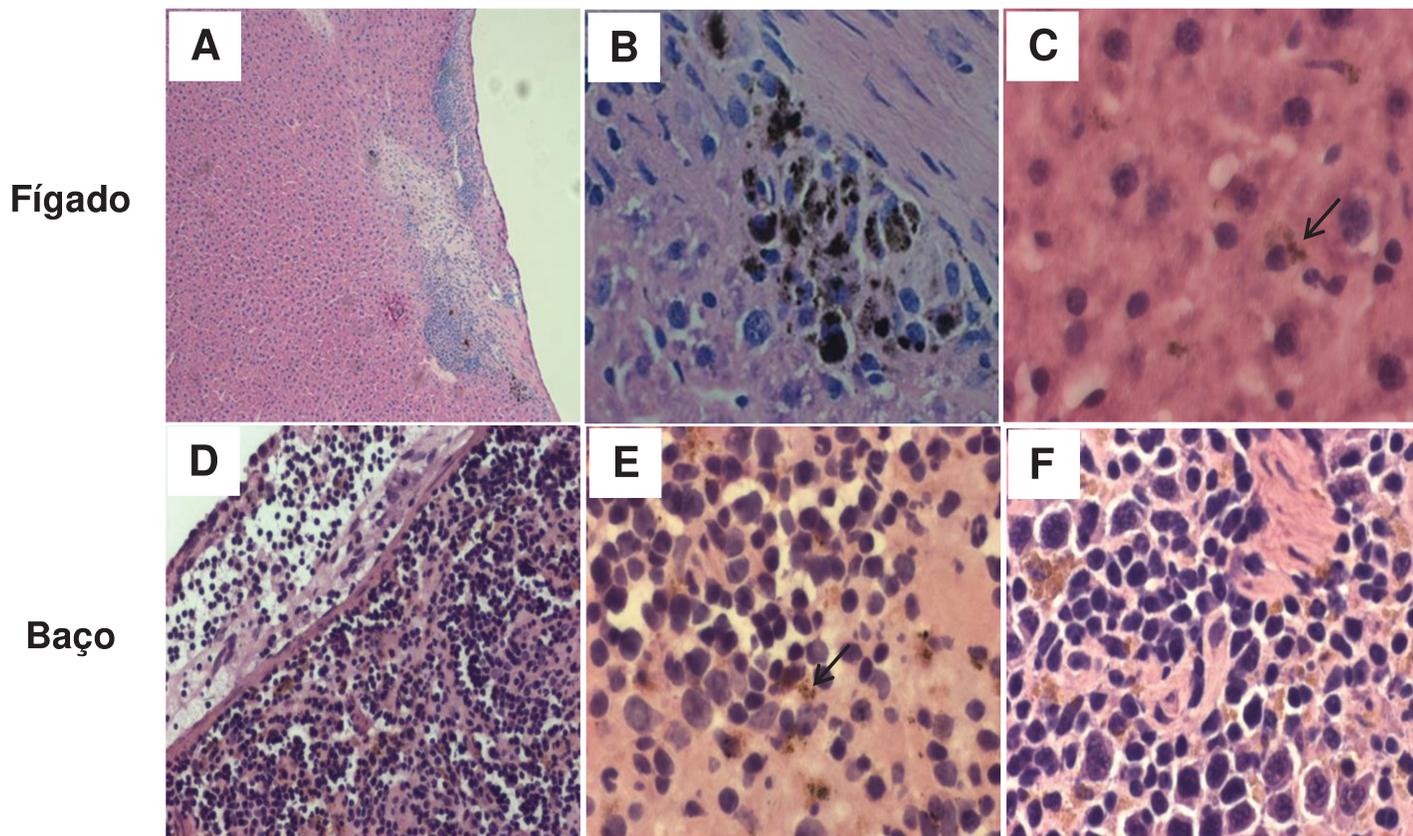


Figura 14: Cortes histológicos (HE) de fígado (A-C) e baço (D-E) de camundongos NOD 24 semanas após administração ip de MWNTC; baço de NOD controle, mesmo tempo experimental (F). As imagens A e B representam a borda externa do fígado e a imagem C seu interior. A imagem D representa a borda externa do baço. Ampliação: x10 (A); x20 (D); x60 (B,C,E,F).

Linfonodo peri-pancreático

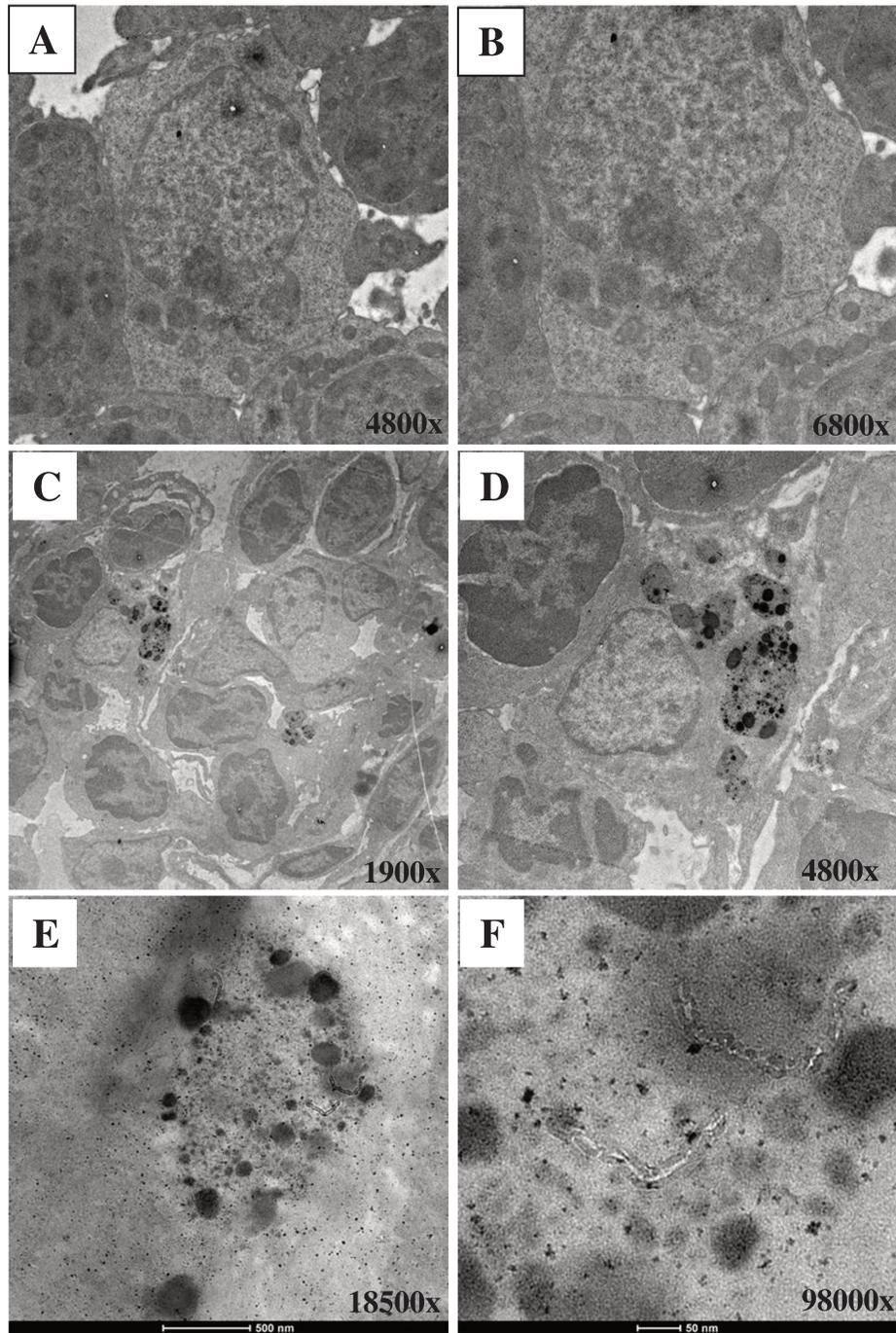


Figura 15: imagens de HRTEM de cortes de linfonodos peri-pancreáticos de animais controle (A, B) e animais tratados com MWNTC após 8 semanas da administração (C-F). MWNTC foram identificados dentro de fagolisossomos de macrófagos, conforme representado na ampliação (E, F) da área das imagens C e D.

Ducto pancreático

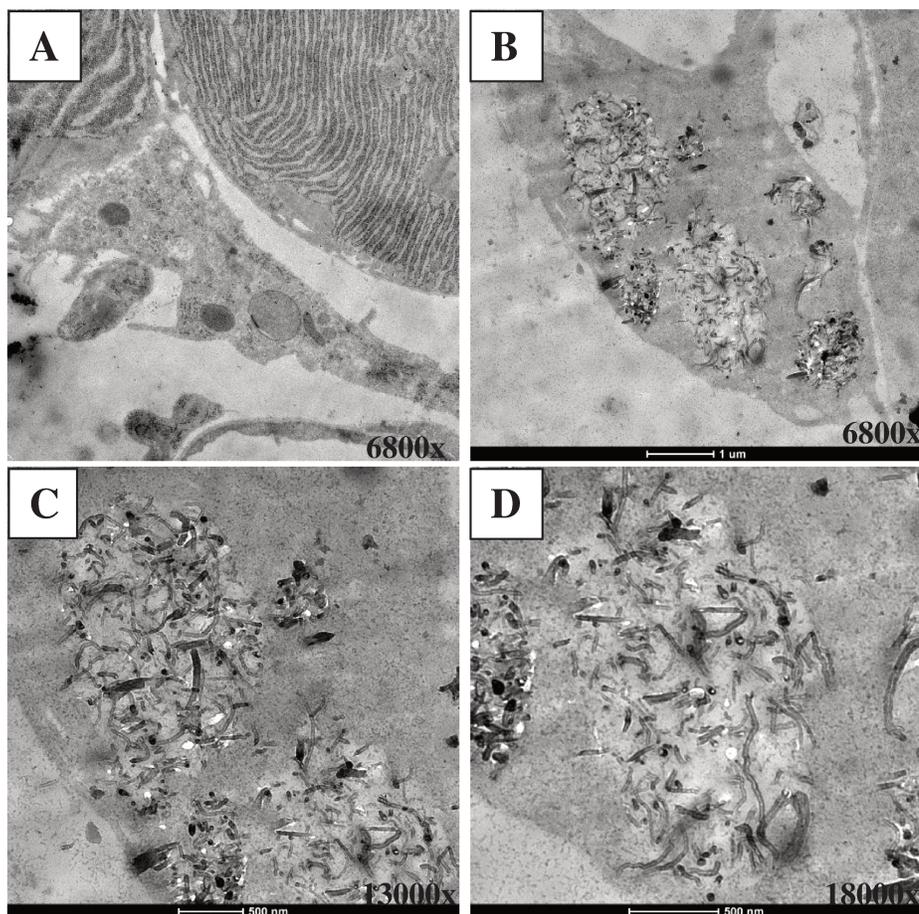


Figura 16: imagens de HRTEM de cortes de pâncreas de animal controle (A) e animais tratados com MWNTC após 8 semanas de administração (B-D). MWNTC foram identificados dentro dos ductos pancreáticos, conforme representado na ampliação (C-D).

DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DO MWNTC NÃO FUNCIONALIZADO NO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES DO CAMUNDONGO NOD

O presente estudo é o primeiro relato sobre o efeito de nanotubos de carbono *in vivo* no desenvolvimento do diabetes autoimune do modelo experimental do camundongo NOD.

Este projeto seguiu a linha de pesquisa iniciada no Laboratório de Neuroimunologia – IB, UNICAMP sobre os efeitos do MWNTC não funcionalizado na resposta imune inata e adaptativa, em diferentes modelos experimentais. A descrita internalização do MWNTC pelo macrófago e sua subsequente ativação (GRECCO *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2013) suscitou o questionamento de seu efeito na evolução do diabetes autoimune.

Estudar o diabetes espontâneo do modelo NOD, o mais amplamente usado para estudo da doença humana (DM1), significa adotar um protocolo de longo seguimento, pois as fêmeas apresentam uma extensa fase de progressão da insulite (pré-diabetes clínico) que dura em torno de 3 a 4 meses a partir do primeiro infiltrado nas ilhotas pancreáticas, na 6^a semana de vida.

Optou-se por usar metodologia similar à já relatada pelo laboratório, uma única dose de 100 µg de MWNTC por via intraperitoneal, que foi injetada antes do início da insulite, em fêmeas NOD/Uni, para poder observar tanto a interferência no desenvolvimento do infiltrado insular quanto do diabetes clínico. Assim, paralelamente, iniciávamos uma avaliação de efeito de longo prazo de nanotubos de carbono em modelo de autoimunidade.

As fêmeas NOD foram criteriosamente seguidas, através de medidas de glicemia semanais para o correto diagnóstico do diabetes clínico. Além disso, a glicemia foi monitorada durante todo o protocolo experimental, até a 30^a semana de vida dos animais. Desta forma, estudou-se também a incidência cumulativa de diabetes apresentada pelas fêmeas NOD/Uni mantidas no biotério do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, bloco F, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Esta incidência de diabetes, no grupo controle, foi menor que a esperada, sendo de 47,6% em fêmeas NOD até a 30^a semana de vida. A colônia de camundongos NOD/Uni utilizada sofreu, porém, uma mudança de incidência do diabetes durante a

realização deste estudo e os dados referentes ao grupo de animais controles foram confirmados pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

A dose única de MWNTC administrada ao animal desencadeou uma hiperglicemia mais intensa, a partir da 10^a semana de vida dos animais (4 semanas após a injeção), sendo mantida até o término do experimento, 24 semanas após a injeção.

Nos animais tratados, observou-se uma forte tendência à antecipação do surgimento do diabetes clínico, com pico de incidência entre a 14^a e a 18^a semanas de vida, o que ocorreu entre a 19^a e a 25^a semanas nos controles. Possivelmente uma maior amostragem apresentaria a evidência, do ponto de vista estatístico.

Assim, animais tratados com MWNTC desenvolveram uma doença com maior gravidade clínica.

Por outro lado, o exame histopatológico dos pâncreas das fêmeas NOD tratadas com MWNTC apresentou características evolutivas de insulite similares às controles. Infiltrados celulares mais extensos começaram a ser detectados em animais com 10 semanas de idade, acometendo progressivamente a maioria das ilhotas a partir da 14^a semana de vida em ambos os grupos experimentais.

Apesar dos animais tratados com MWNTC não terem apresentado antecipação da insulite histológica, sabe-se que o controle do desenvolvimento do diabetes no camundongo NOD é multifatorial, como amplamente relatado (KIKUTANI; MAKINO, 1992). A progressão da insulite autoimune para o diabetes, diagnosticado clinicamente por franca hiperglicemia, depende de fenômenos inflamatórios e transtornos da regulação imunológica que resultam na expansão de células T diabetogênicas, com destruição irreversível das células β pancreáticas.

Em decorrência destes achados, o desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD pode ser dividido em dois períodos: 1) início da insulite autoimune e 2) destruição das células β e diabetes clínico. Genes diabetogênicos ligados ou não ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) influenciam estes diferentes estágios de forma diferenciada (KIKUTANI; MAKINO, 1992).

A hiperglicemia ocorre quando as células β estão funcionalmente danificadas, o que não pode ser mensurado por análise histológica de quantificação de insulite, como a realizada neste estudo. Pode-se supor, entretanto, que o MWNTC interferiu *in vivo* no processo de progressão da destruição autoimune das células β que promove o diabetes clínico em fêmeas NOD.

A destruição tissular em doenças autoimunes, como ocorre no diabetes tipo 1, está associada com a presença de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 (RABINOVITCH,1998). Foi relatado que a expressão de $\text{TNF}\alpha$ está mais relacionada com o desenvolvimento e manutenção da insulite, enquanto a expressão de $\text{INF}\gamma$ está relacionada diretamente com a insulite destrutiva da ilhota e com o desenvolvimento do diabetes no camundongo NOD (VENTURA-OLIVEIRA *et al.*, 2002; VUKKADAPU *et al.*, 2005). Por outro lado, $\text{TGF}\beta$ e IL-10 agem principalmente suprimindo a inflamação e foram descritas funções de regulação de células T auto-reativas no camundongo NOD (HILL, SARVETNICK, 2002).

Neste estudo, optou-se pela análise de um perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias previamente avaliadas no laboratório, em fase aguda após a exposição à MWNTC. Foi focada a expressão evolutiva destas citocinas em linfonodos peri-pancreáticos, sítio de ativação de células T reativas contra antígenos da célula β pancreática.

Nossa análise demonstrou claramente diferenças significativas na expressão de mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias em células de linfonodos peri-pancreáticos em animais NOD, longo prazo após uma única aplicação intraperitoneal de MWNTC, em comparação com os controles.

Foi identificado um aumento tardio da expressão de mRNA de $\text{INF}\gamma$ em fêmeas NOD de 20 semanas de idade, 14 semanas após tratamento com MWNTC.

Por outro lado, a expressão de mRNA de $\text{TNF}\alpha$ foi diminuída, em relação aos NOD controles, entre 8 e 14 semanas após o tratamento (idades dos animais: 14 e 20 semanas, respectivamente). Ressalta-se, contudo, que a administração de MWNTC não impede o aumento progressivo de $\text{TNF}\alpha$ ao longo do seguimento dos animais, mas este é significativo mais tardiamente (30 semanas de idade) em relação às fêmeas NOD controles (20 semanas de idade).

A administração de MWNTC também promoveu, tardiamente, uma redução da expressão de mRNA de TGF β , detectada em animais NOD de 30 semanas de idade, 24 semanas após o tratamento e momento de término deste protocolo experimental.

Este estudo revela que os efeitos imuno-estimulatórios do MWNTC, descritos a curto prazo, em nosso laboratório (GRECCO *et al.*, 2011), encontram-se presentes até, pelo menos, 24 semanas após sua administração, em fêmeas NOD tratadas. Recentemente, aumento da expressão de INF γ e diminuição de TNF α e TGF β foram associadas à redução da velocidade de crescimento de tumor (células de carcinoma de pulmão) em camundongos, 3 dias após injeção única de MWNTC (PAULA, 2012).

São raros os estudos que avaliam os efeitos tardios da exposição ao nanotubo. Em 2012, YAMAGUCHI e colaboradores demonstraram que MWNTC não funcionalizados exercem efeitos mais fortes e prolongados na resposta imune e inflamatória que outras fibras minerais similares, após administração única por via intraperitoneal em camundongos. Estes autores observaram expressão exacerbada de mRNA de várias citocinas pró-inflamatórias em células peritoneais e evidenciaram que os níveis de expressão de INF γ e IL-2 permaneciam altos após 20 semanas de tratamento.

Nossos resultados demonstram o impacto deste efeito inflamatório do MWNTC não funcionalizado, em longo prazo, num modelo experimental de diabetes autoimune. Como será descrito a seguir, a presença de MWNTC foi identificada dentro de células fagocitárias em linfonodo peri-pancreático, até o término do seguimento dos animais, 24 semanas após administração do nanotubo. Apesar de não ter sido feita análise funcional, um aumento de INF γ , desencadeado pela presença de MWNTC, no ambiente de “recrutamento” de células TCD4+ reativas às células β poderia acelerar o início do diabetes em fêmeas NOD.

Os efeitos pró-inflamatórios de INF γ são bem estabelecidos, ativando macrófagos a produzir TNF α e IL-1 e consequente manutenção da inflamação (RABINOVITCH, 1998). Por outro lado, IL-10 e TGF β agem principalmente suprimindo a inflamação e foram associadas com a regulação de células T autoreativas em camundongos NOD (HILL, SARVETNICK, 2002). O desequilíbrio entre células T efetoras e reguladoras aumentaria a probabilidade de destruição das células β e início

da hiperglicemia. Dados recentes discutem que o início do diabetes dependeria de diferenças qualitativas das células T efetoras, dependentes da idade do animal, que se tornariam progressivamente insensíveis à ação reguladora de TGF β (YOU et al., 2005; MELLANBY et al., 2007).

Nosso estudo evidenciou que o MWNTC induziu uma resposta Th1 mais acentuada em camundongos NOD/Uni idosos. Observamos, nos animais de 20 semanas de idade, que a relação INF γ /TGF β e INF γ /IL10 estava, respectivamente, 33 e 126 vezes maior no grupo tratado em comparação com o grupo controle. Mais tardiamente, em animais de 30 semanas de idade, a relação TNF α /TGF β e TNF α /IL10 estava, respectivamente, 10 e 7 vezes maior, assim como a relação INF γ /TGF β e INF γ /IL10 mantinha-se proporcionalmente elevada (10 e 6 vezes, respectivamente, maior que os controles).

Estes achados abrem o questionamento se a permanência do MWNTC em células de linfonodo peri-pancreático poderia prover, em longo prazo, persistência de estímulo inflamatório com possível modulação positiva da capacidade diabetogênica de células efetoras da destruição das células β do camundongo NOD/Uni.

5.2 PERSISTÊNCIA DE MWNTC NÃO FUNCIONALIZADO POR LONGO PRAZO EM ÓRGÃOS DO SISTEMA RETICULO-ENDOTELIAL E PÂNCREAS DE FÊMEAS NOD TRATADAS

O presente estudo focou também o potencial do MWNTC não funcionalizado ser transportado e retido a longo prazo no sistema reticulo-endotelial após uma única administração intraperitoneal no camundongo NOD.

Para melhor compreender o período de aparecimento do nanotubo nestes sítios, a análise histológica foi realizada em períodos distintos após a administração de MWNTC: fase aguda (1 e 7 dias após injeção) e fase a longo prazo (até 24 semanas após injeção).

A identificação visual do material negro característico do nanotubo, durante o sacrifício dos animais, orientou a seleção dos órgãos.

Logo após a administração de MWNTC, observou-se no fígado um extenso infiltrado inflamatório leucocitário ao redor dos agregados de MWNTC, com ruptura da membrana hepática e degeneração de hepatócitos. No interior do órgão, MWNTC foi localizado no citoplasma de células de Kupffer, achado anteriormente confirmado em diversos estudos de análise de biodistribuição de nanotubo a curto prazo (LACERDA *et al.*, 2008).

Paralelamente, o MWNTC foi detectado, desde o início, no conteúdo citoplasmático de células fagocitárias de linfonodo peri-pancreático. No mesmo período, no pâncreas, grandes aglomerados de MWNTC foram também identificados na parede de ductos dos vários lobos do pâncreas, nos septos interlobulares, vindo a desembocar nos grandes ductos. Este achado não havia sido antes demonstrado e uma possível difusão do nanotubo para a parede do ducto pode ter ocorrido, sem contudo causar dano morfológico na área do pâncreas exócrino.

Seis meses após a injeção única de MWNTC, o nanotubo persiste em fígado, baço, linfonodos peri-pancreáticos e dentro dos ductos pancreáticos de fêmeas NOD tratadas. Imagens de HRTEM confirmaram a característica estrutural do MWNTC utilizado dentro de fagolissomos de macrófago e, em grandes quantidades, na parede dos ductos pancreáticos.

Recentemente, Yamaguchi e colaboradores (2012) também observaram mudanças morfológicas agressivas com infiltrado de macrófagos, eosinófilos e células mielóides imaturas no fígado, ocasionando granuloma e severa fibrose no interior do órgão, 20 semanas após administração única de MWNTC.

Nossos dados evolutivos mostraram redução aparente do infiltrado inflamatório na parede do fígado, o que pode sugerir uma possível degradação enzimática *in vivo*. Entretanto, seis meses é um período considerado bastante longo, ao se considerar a vida média do camundongo e pode-se questionar “como” o MWNTC não funcionalizado poderia ser totalmente eliminado do organismo.

Ciclos de tentativas frustradas de fagocitose de MWNTC por macrófagos foram previamente descritos, sugerindo inflamação sustentada e toxicidade (POLAND *et al.*, 2008).

Neste estudo, foi demonstrada a capacidade do MWNTC não funcionalizado ficar detido, a longo prazo, no sistema reticulo-endotelial, após uma única dose sistêmica em fêmeas NOD. Apesar do descrito clearance rápido do sangue e da suposta biodegradação, mesmo que parcial, os nanotubos de carbono permaneceram em células fagocitárias de fígado, baço e linfonodos peri-pancreáticos, até 24 semanas após sua administração.

Nossos resultados indicam que houve consequência funcional da permanência do MWNTC não funcionalizado em linfonodo peri-pancreático do camundongo NOD. Uma única injeção do nanotubo causou resposta inflamatória crônica, denotada pelo aumento da relação entre citocinas pró e anti-inflamatórias, associado a maior gravidade do diabetes autoimune.

A incidência aumentada de doenças autoimunes em indivíduos expostos a partículas, como asbestos e sílica foi já anteriormente descrita na literatura (ROCHA *et al.*, 2012; PARKS, CONRAD, COOPER, 1999).

Os nanotubos comerciais utilizados em diversos campos da tecnologia moderna são partículas não modificadas. Mesmo compreendendo a necessidade de se modificar a nanoestrutura para vislumbrar sua aplicação em medicina, relevância deve ser dada para o risco de exposição humana e ambiental ocorrendo neste momento.

CONCLUSÃO

- O tratamento precoce com dose única de MWNTC não funcionalizado, por via intraperitoneal, desencadeou hiperglicemia com maior gravidade em fêmeas NOD/Uni, mantida até o término do experimento, 6 meses após a administração, com tendência à antecipação do surgimento do diabetes clínico.

- Após uma única administração, o MWNTC não funcionalizado foi transportado e retido em longo prazo no sistema reticulo-endotelial do camundongo NOD/Uni, sendo identificado morfológicamente em células fagocitárias de fígado, baço e linfonodo peri-pancreático 6 meses após a injeção. Além destes sítios, acúmulos do nanotubo persistiram em paredes de ductos pancreáticos, sem causar dano aparente no pâncreas exócrino.

- A persistência do MWNTC não funcionalizado em linfonodo peri-pancreático, após uma única injeção, apresentou provável interferência funcional no processo de progressão da destruição autoimune das células β que promove o diabetes clínico em fêmeas NOD/Uni. O MWNTC induziu uma resposta Th1 mais acentuada nos animais tratados, entre a 14^a e a 20^a semana de vida (momento de insulite extensa), com aumento da expressão de $\text{INF}\gamma$ e aumento da relação $\text{INF}\gamma/\text{TGF}\beta$ e $\text{INF}\gamma/\text{IL}10$. Esta relação permanece elevada na 30^a semana de vida das fêmeas NOD tratadas, com reduzida expressão de $\text{TGF}\beta$.

- Os nanotubos comerciais utilizados em diversos campos da tecnologia moderna são partículas não modificadas. Mesmo compreendendo a necessidade de se modificar a nanoestrutura para vislumbrar sua aplicação em medicina, relevância deve ser dada para o risco de exposição humana e ambiental ocorrendo neste momento. Uma resposta inflamatória crônica, com aumento da relação entre citocinas pró/anti-inflamatórias, pode ser associada a maior gravidade de doenças autoimunes em organismos suscetíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7^a Ed., Rio de Janeiro, 2012.

AKERBLOM, H.K. *et al.* Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet.* 115(1):18-29, 2002.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** 1:S67-74. doi: 10.2337/dc13-S067, 2013.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD Mouse: A Model of Immune Dysregulation. **Annu. Rev. Immunol.** 23:447-85, 2005.

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

CARNAUD, C. The contribution of animal models to the understanding of the pathogenesis of type 1 diabetes. **Braz J Med Biol Res.** 28(8):925-9, 1995.

CERAGIOLI, H.J.; PETERLEVITZ, A.C.; QUISPE, J.C.R.; BARANAUSKAS, V. Growth and characterization of carbon nanofibers by a technique of polymer doped catalyst and hot-filament chemical vapor deposition. **Vacuum.** doi:10.1016/j.vacuum.2008.07.004, 2008.

CERAGIOLI, H.J.; PETERLEVITZ, A.C.; QUISPE, J.C.R.; LARENA, A.; PASQUETTO, M.P.; SAMPAIO, M.A.; BARANAUSKAS, V. Synthesis and characterization of boron-doped carbon nanotubes. **J. Phys.** 100 052029, doi: 10.1088/1742-6596/100/5/052029, 2008.

CLICHICI, S. *et al.* Transient oxidative stress and inflammation after intraperitoneal administration of multiwalled carbon nanotubes functionalized with single strand DNA in rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** 15;259(3):281-92. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.004, 2012.

DENG, X. *et al.* Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. **Carbon.** 45(7): 1419–1424, 2007.

DIANA, J.; BREZAR, V.; BEAUDOIN, L.; DALOD, M.; MELLOR, A.; TAFURI, A.; VON HERRATH, M.; BOITARD, C.; MALLONE, R.; LEHUEN, A. Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. **J. Exp. Med.** 208:729-745, 2011.

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

GRECCO, A.C.P. *et al.* Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes. **Nanotechnology.** 22(26):265103, 2011.

GUO, J. *et al.* Biodistribution of functionalized multiwall carbon nanotubes in mice. **Nucl Med Biol.** 34(5):579-83, 2007.

HERRERO, M.A.; TOMA, F.M.; AL-JAMAL, K.T.; KOSTARELOS, K.; BIANCO, A.; DA ROS, T.; BANO, F.; CASALIS, L.; SCOLES, G.; PRATO, M. Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery. **J Am Chem Soc.** 22;131(28):9843-8, 2009.

HILL, N.; SARVETNICK, N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. **Curr Opin Immunol.** 14(6):791-7, 2002.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature.** 354:56-58, 1991.

JAHROMI, M.M.; EISENBARTH, G.S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cell Mol Life Sci.** 64(7-8):865-72, 2007.

JORIO, A.; KAUPPINEN, E.; HASSANIEN, A. Carbon-nanotube metrology. **Carbon Nanotubes, Topics Appl. Physics.** 111, 63-100, 2008.

KAGAN, V.E. *et al.* Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. **Nat Nanotechnol.** 5(5):354-9. doi: 10.1038, 2010.

KANTÁROVÁ, D.; BUC, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. **Physiol Res.** 56(3):255-66, 2007.

KIKUTANI, H.; MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv Immunol.** 51:285-322, 1992.

LACERDA, L. *et al.* Tissue histology and physiology following intravenous administration of different types of functionalized multiwalled carbon nanotubes. **Nanomedicine (Lond).** 3(2):149-61. doi: 10.2217/17435889.3.2.149, 2008

LAM, C., JAMES, J.T., MACCLUSKEY, R., AREPALLI, S., HUNTER, R.L. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. **Critical Reviews in Toxicology.** 36:189–217, 2006.

LAM, C.W.; JAMES, J.T.; MCCLUSKEY, R.; HUNTER, R.L. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. **Toxicol. Sci.** 77, 126–134, 2004.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Exp. Anim.** 29:1-13, 1980.

MAYNARD, A.D.; BARON, P.A.; FOLEY, M.; SHVEDOVA, A.A.; KISIN, E.R.; CASTRANOVA, V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. **J. Toxicol. Environ. Health.** A 67, 87–107, 2004.

MIZUTANI, Érika. Nanotubos de carbono não funcionalizados suprimem a encefalomielite experimental auto-imune prejudicando a apresentação do neuro-antígeno. 2009. 53p. Dissertação–Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MORAES, A.S. *et al.* The suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells induced by multi-walled carbon nanotubes reduces the severity of autoimmune experimental encephalomyelitis. **CNS Neuroscience & Therapeutics.** *In press*, 2013.

MORAES, Adriel dos Santos. Administração de nanotubos de carbono multiwalled “*in vivo*” ativa citotoxicidade tumor- específica de linfócitos T CD8. 2012. 60p. Tese–Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MOUCHESS, M.L.; ANDERSON, M. Central Tolerance Induction. **Curr Top Microbiol Immunol.** [Epub ahead of print], 2013

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.

PARKS, C.G.; CONRAD, K.; COOPER, G.S. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. **Environ Health Perspect.** 107(Suppl 5): 793–802, 1999.

PAULA, Rosemeire Florêça de Oliveira. Efeito da administração de nanotubos de carbono na resposta imune de camundongos portadores de carcinoma de pulmão.

2012. 54p. Dissertação–Mestrado em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PAUTLER, M.; BRENNER, S. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. **International Journal of Nanomedicine**. (5): 803-809, 2010.

PAVIN, E.J.; ZOLLNER, R.L. Implantação da linhagem “NOD-MICE” (camundongos diabéticos não obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças auto-imunes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 38:105-8, 1994.

POLAND, C.A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W.A.H.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat. Nanotech.** 2008.

RABINOVITCH, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev.** 14(2):129-51, 1998.

REILLY, R.M. Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. **The Journal of Nuclear Medicine**. 48: 1039-1042, 2007.

RIVIERE, J.E. Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.** 1(1):26-34. doi: 10.1002, 2009.

ROCHA, M. C. *et al.* Genetic polymorphisms and surface expression of CTLA-4 and PD-1 on T cells of silica-exposed workers. **Int. J. Hyg. Environ Health** 215(6):562-9, 2012.

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.

SAKAMOTO, Y. *et al.* Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. **J Toxicol Sci.** 34(1):65-76, 2009.

SILVA, M.E.R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 52: 166-180, 2008.

SILVA, Vania Daniela Ramos. Expressão do receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) em macrófagos, células dendríticas e células tumorais após internalização de nanotubos de carbono. 2011. 66p. Dissertação–Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SIMÕES, G.F.; OLIVEIRA, A.L. Granulocyte-colony stimulating factor improves MDX mouse response to peripheral nerve injury. **PLoS One.** 7(8):e42803. doi: 10.1371, 2012.

SINGH, R. *et al.* Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **Proc Natl Acad Sci USA.** 103(9): 3357–3362, 2006.

SOUZA FILHO, A.G., FAGAN, S.B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Quim. Nova.** 30 (7): 1695-1703, 2007.

THIVOLET, C.; BENDELAC, A.; BEDOSSA, P.; BACH, J.F.; CARNAUD, C. CD8+ T cell homing to the pancreas in the non obese diabetic mouse is CD4+ T cell-dependent. **J. Immunol.** 146:85-8, 1991.

THOMAS, H.E. *et al.* Beta cell apoptosis in diabetes. **Diabetes and Apoptosis.** 14:1389–1404, 2009.

THOMAS, H.E. *et al.* Proinflammatory cytokines contribute to development and function of regulatory T cells in type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci.** doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06797.x, 2012.

THURNHERR, T. *et al.* A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro. **Toxicol Lett.** 200(3):176-86. doi: 10.1016, 2011.

VENTURA-OLIVEIRA, D. *et al.* Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. **Braz J Med Biol Res.** 35(11):1347-55, 2002.

VUKKADAPU, S.S. *et al.* Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. **Physiol Genomics.** 14;21(2):201-11, 2005.

YAMAGUCHI, A. *et al.* Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice. **J Toxicol Sci.** 37(1):177-89, 2012.

YANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, S.; CAI, Z.; JIA, Y.; MA, Y.; ZHENG, C.; LU, Y.; RODEN, R.; AND CHEN Y. Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells. **Gen Therapy.** 13:1714-1723, 2006.

YOU, S. *et al.* Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. **Diabetes.** 54(5):1415-22, 2005.

ZHAO, B.Q.; WAGNER, H.D. Raman spectroscopy of carbon-nanotube-based composites. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.** (362), 2407-2424, 2004.

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

Apresentação do artigo:

Long-term retention of nonfunctionalized carbon nanotubes in pancreatic lymph nodes of mice treated with a single intraperitoneal injection dose

1. Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) have been extensively produced nanomaterials since its first characterization twenty years ago (IIJIMA, 1991). The perspective of widespread applications of these materials in medicine raised the research regarding their safety in human healthy. On the other hand, the large-scale manipulation of CNTs for industrial purposes increases direct human exposure and any critical effect in our healthy should be investigated.

Long term studies of *in vivo* effects of industrial CTNs in immune cells or even the overseeing of their tissue deposition are rare. The presence in the body of inert substances such as silica and asbestos has been associated with increased incidence of autoimmune diseases (ROCHA *et al.*, 2012; PARKS, CONRAD, COOPER, 1999). However, little is known about the effect of carbon nanotubes inoculated in rodents either in the induction or in the reduction of the autoimmune diseases. This may be explained by the difficulty to understand the clearance of these nanoparticles and if the residual carbon nanotubes can be retained in the lymphoid organs perpetuating the immune stimulation.

In fact, our group studying the effects of nonfuncionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in the immune system, reported that they triggered a pro-inflammatory response in mice at least up to 15 days after a single intravenous administration (GRECCO *et al.*, 2011). MWCNTs are internalized by macrophages stimulating the expression of IL-12, TNF α and IL-6 and further promotion of the adaptive immune response, through the activation of T lymphocytes and production of antigen-specific T cells and antibodies.

Macrophages are antigen-presenting cells found in all organs and connective tissues and together with dendritic cells can capture foreign antigens, transport them to lymphoid organs (ABBAS *et al.*, 2012). Therefore, it is important to consider whether the carbon nanotubes, while being easily cleared from blood, can persist in body through the lymphatic system uptake.

Recently, it was demonstrated that IgG-functionalized carbon nanotubes can be biodegraded by the human neutrophil enzyme myeloperoxidase *in vitro*, particularly by neutrophils and partially by macrophages, that contain lower levels of this enzyme

(KAGAN *et al.*, 2010). This study discusses this biodegradation process as a way for reduction of the pro-inflammatory effects of CNTs since used in appropriate concentrations that do not exceed the ability of the enzyme system.

On the other hand, the authors described that only 30% of non-functionalized CTNs were degraded under the same conditions. These data could explain, at least in part, the induction of acute inflammation and granuloma formation observed in different experimental models using non modified CTNs or doses with potential toxicity.

The present work was conducted to evaluate the capacity of MWCNTs to be long-term trapped in the RE system after a single systemic dose in mice. The target organs studied were liver and lymph nodes including the pancreatic ones, which is relevant because NOD mice are sensitive to the development of type 1 diabetes. We described that despite the rapid blood clearance and the supposed biodegradation, even partially, CNTs remain long time in regional pancreatic lymph nodes phagocytic cells, till 24 weeks after a single administration.

2. Materials and methods

2.1 Carbon nanotubes preparation

Nonfunctionalized MWCNTs (length: 0,5 – 40 μm ; diameter: 10 – 30 nm; purity: >95%, Helix, USA) were sterilized (at 121°C for 2h in an autoclave to remove possible contaminated endotoxins) and suspended in a solution of 0,01% F-127 Pluronic® (Sigma, St Louis, MO, USA) in Ca^{++} and Mg^{++} free PBS. The nanotube morphology was checked by transmission electron microscopy, and Raman spectra were recorded using Renishaw microprobe system ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$) with Argon laser (6mW).

2.2 Animals and experimental design

Six week old non-obese diabetic (NOD) female mice purchase from Experimental Animal Facility and Breeding Center of University of Campinas (CEMIB, UNICAMP) were housed and fed under specific pathogen-free (SPF) conditions and randomly distributed in two groups. The experimental group (n=12) received a single intraperitoneal injection of 100 μg MWCTN diluted in 100 μL of (0,01% F-127 Pluronic® in Ca^{++} and Mg^{++} free PBS). Control group (n=20) mice received an equal volume of vehicle alone. We chose the intraperitoneal route due to the limited CNT dispersion and increased difficulties for the use of intravenous injections as confirmed in our previous experiments.

All experimental procedures and animal handling were carried out in accordance with to the Brazilian Council on Animal Care guideline and approved by the University Committee for Ethical Animal Experimentation (CEEA UNICAMP 2503-1).

2.3 Histological analyses

Two paired animals from each group were sacrificed at 0, 24h and 1, 8, 14 and 24 weeks after injection. The pancreatic (PLN) and mesenteric (MLN) lymph nodes spleen and liver samples were collected and embedded in OCT-compound (Tissue-Tek, Sakura, USA) and immediately snap-frozen in liquid nitrogen and 5 μm thick cryosections (Leica CM 1850, Germany) of, were collected on glass slides and stored at -80°C. The sections were stained with Hematoxylin-Eosin and analyzed under bright field microscopy.

2.4 Ultrastructural analysis

After 8 weeks of MWCTN treated and control mice were anesthetized with 50 mg/kg Ketamine (Fort Dodge) and 10mg/kg Xylazine (Körnig) and underwent thoracotomy for perfusion fixation using infusion pump. In order to avoid intravascular blood clotting heparinized 0.9% NaCl were perfused through the heart left ventricle prior to perfusion of 20 ml 2% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde in 100mM phosphate buffer, pH 7.38.

The pancreatic lymph nodes (PLNs) were removed and post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol gradient and embedded with epoxy-resin (Durcupan, Fluka, Steinheim, Switzerland). Ultrathin sections collected on formvar-coated copper grids were uranyl acetate and lead citrate stained, and analyzed with a Tecnai Biotwin G² Spirit transmission electron microscope (FEI Company, The Netherlands), at 120 kV an digital images were collected by Eagle 2 K video camera and Vector Graphics software (FEI Company, The Netherlands). Reticuloendothelial cells, dendritic cells, macrophages were identified based on the cell size and characteristics of the nuclear chromatin.

3. Results and discussion

Presence of MWCNT

1) Macroscopic aspects

In the present study, we focused on the potential of MWCNTs to be transported and retained for a long time in the RE system after a single systemic administration in mice. Using a similar protocol of our previous study (GRECCO *et al.*, 2011), mice aged 6 weeks received a single 100 µg dose of the MWCNT preparation into the peritoneal cavity and were sacrificed at 1 day and then 1, 8, 14 and 24 weeks after the injection.

At the moment of sacrifice, at the different times, surveying the animal organs, we could identify variable but visible black material depots mainly in liver (Figure 2A) and the pancreatic lymph nodes (PLNs) of treated mice. Figure 2B shows a photograph of PLNs of mice at 8 week post injection. For the mentioned purpose, liver and these lymph nodes were then selected to be extracted for morphological analysis. No mortality was detected as a result of this treatment.

2) Microscopic aspects

This longitudinal tissue histology study comprised two periods after MWCNT injection: acute phase (up to 1 week) and long-term phase (up to 24 weeks). Liver and PLNs were examined.

Acute phase study

The acute phase comprised the analysis at 24 h and 7 days post-CNT administration. Viewed as dense black material, MWCTNs were observed in both liver and PLN of treated mice by histological examination (HE stain). In liver, extensive inflammatory infiltrate was triggered around CTN aggregates soon after its administration, as described in Figure 3 (A-D). A granuloma-like inflammation was detected at the liver surface.

In this phase, the MWCNT uptake in PLNs was seen since 24 hours after injection (Figure 4).

Long-term phase study

Histological data concerning the long-term phase study showed that the MWCNT material was also clearly visualized in liver and PLNs of treated mice.

The finding of macroscopic accumulation of CNT in PLN prompted us to determine its exact localization in the tissue. MWCTNs were observed at all times of the animal's follow-up designed for this long-term phase study, what represents up to 24 weeks after ip injection. Light microscopy images of 14, 20 and 30 weeks old-treated animals (8, 14 and 24 weeks after injection) are shown in the Figure 5.

Variable amounts of the carbon nanotube material were seen within the cytoplasmic content of cells, probably dendritic cells or reticular cells or even large histiocytes.

The detection of CNT in pancreatic lymph node was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) analysis. Figure 6 shows a PLN of a 14 weeks-old treated mouse (8 weeks after injection). MWCNTs, with their characteristic structure, were found into phagolysosomes of cells with macrophages features.

In the liver, even 24 weeks after injection, the granulomatous inflammatory response persisted. Despite its apparent resolution process, a lymphomononuclear infiltrate was found as described in Figure 3 (E-F).

3. Conclusions

Our study provides one of the longest *in vivo* follow-up data after systemic administration of CNT. Well-characterized non-functionalized MWCNTs were found in phagocytic cells of regional pancreatic lymph nodes even 6 months after a single injection. Despite the described rapid blood clearance, we observed that MWCNTs may be transported via lymphatic system and have long body persistence.

Enzymatic biodegradation of functionalized single-walled nanotubes by neutrophils was demonstrated *in vitro* (KAGAN *et al.*, 2010). In our TEM analyses, we observed that MWCNTs were internalized by phagocytic cells. It is possible that enzymatic degradation may occur *in vivo*, as noted by the apparent partial elimination of MWCNTs in liver surface. However, six months is too long a period considering the life-span of mice and we can argue how these nanotubes could be totally eliminated.

The functional consequences of the MWCNT permanence in lymph node tissue were not analyzed at this time. Nevertheless, tissue macrophages are pivotal for the innate immune system. If they function as “reservoirs” for nanotubes or can trigger chronic inflammatory responses must be further evaluated. Confirming this concerning, the increase incidence of autoimmune diseases in individuals exposed to particles such as asbestos and silica is well described in the literature (ROCHA *et al.*, 2012; PARKS, CONRAD, COOPER, 1999).

Commercial nanotubes used in several technology fields are non-modified particles. Even understanding the need to modify the nanostructure to their application in medicine, relevance should be given to the level of environmental and human exposure occurring at this moment.

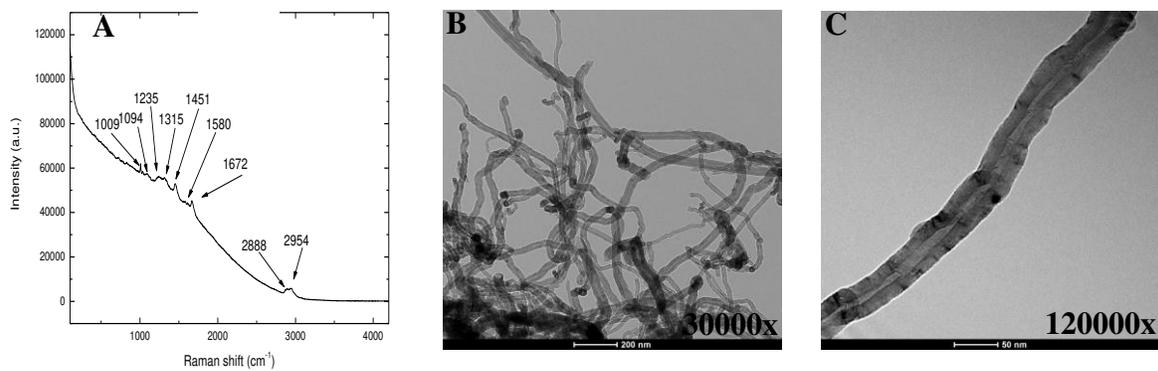


Figure 1 Raman spectrum of the MWCNT preparation (A). Transmission electron microscopy images of the MWCNT preparation structure injected in mice (B,C).

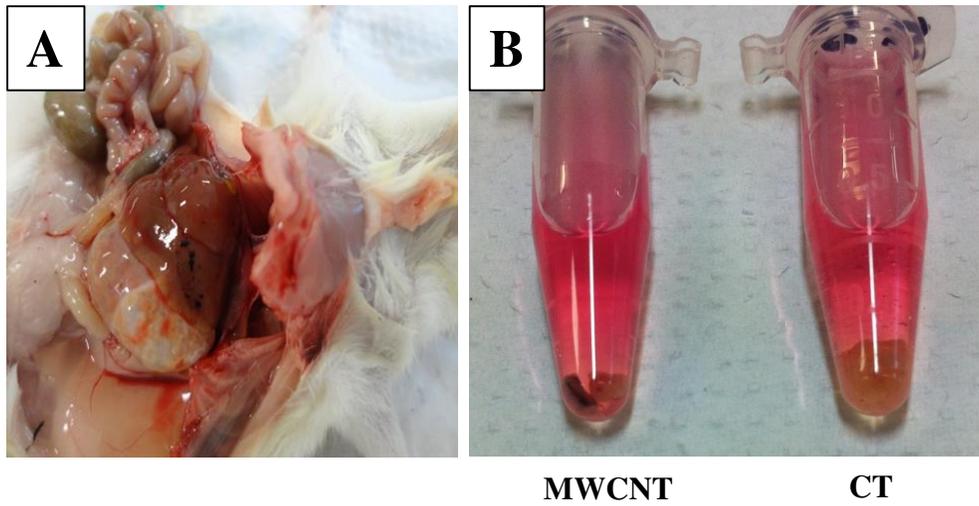


Figure 2 **A** Photograph of the peritoneal cavity from treated mouse 24 h after injection showing MWCNT deposits in liver. **B** Photograph of PLNs immediately after extraction; treated and control mice at 8 weeks after MWCNT injection.

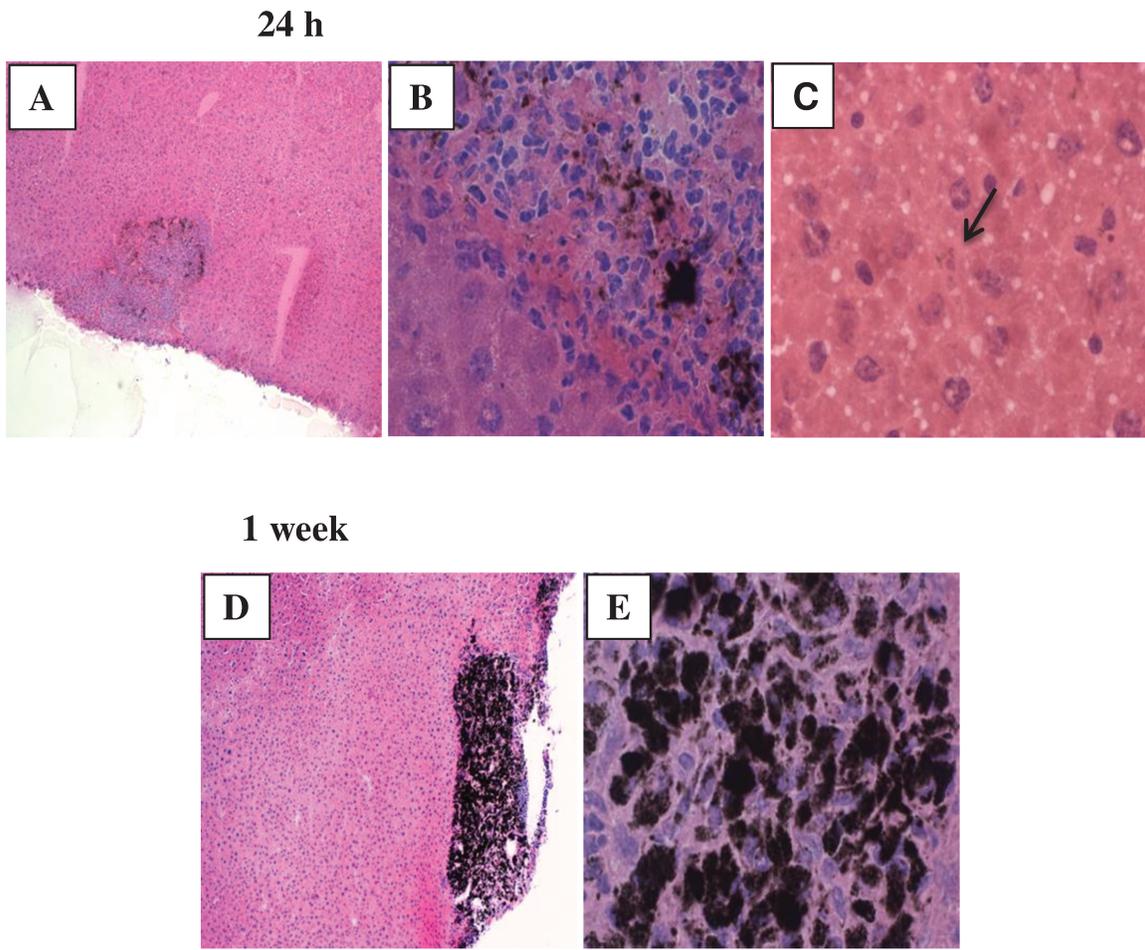


Figure 3 Histological sections (hematoxylin-eosin staining) of liver of mice at 24 hours (A-C) and 1 week (D-E) post ip administration of MWCNT.

Magnification: x10 (A,D); x60 (B,C,E)

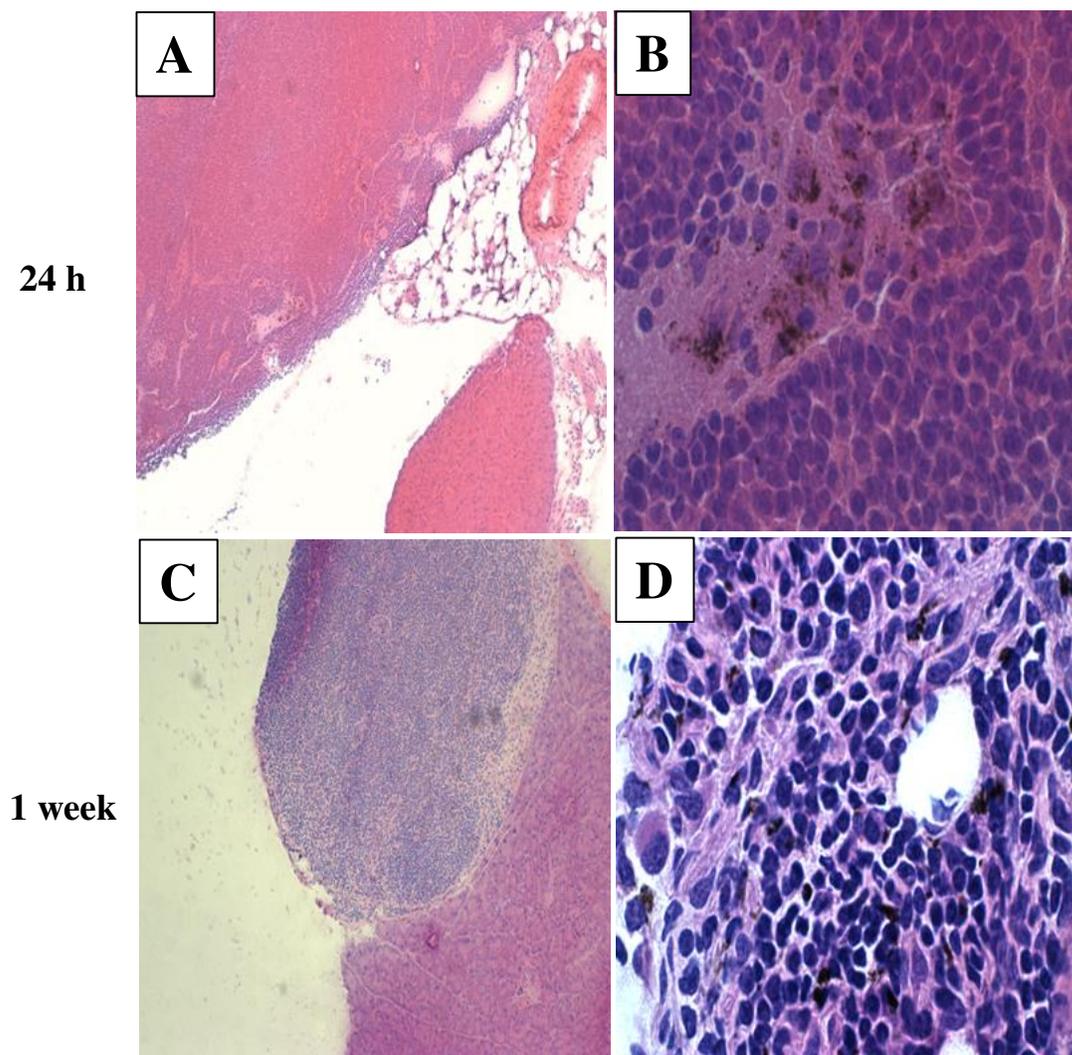


Figure 4 Histological sections (hematoxylin-eosin staining) of pancreatic lymph nodes of mice at 24 hours (A-B) and 1 week (C-D) post ip administration of MWCNT.

Magnification: x10 (A,C); x100 (B, D)

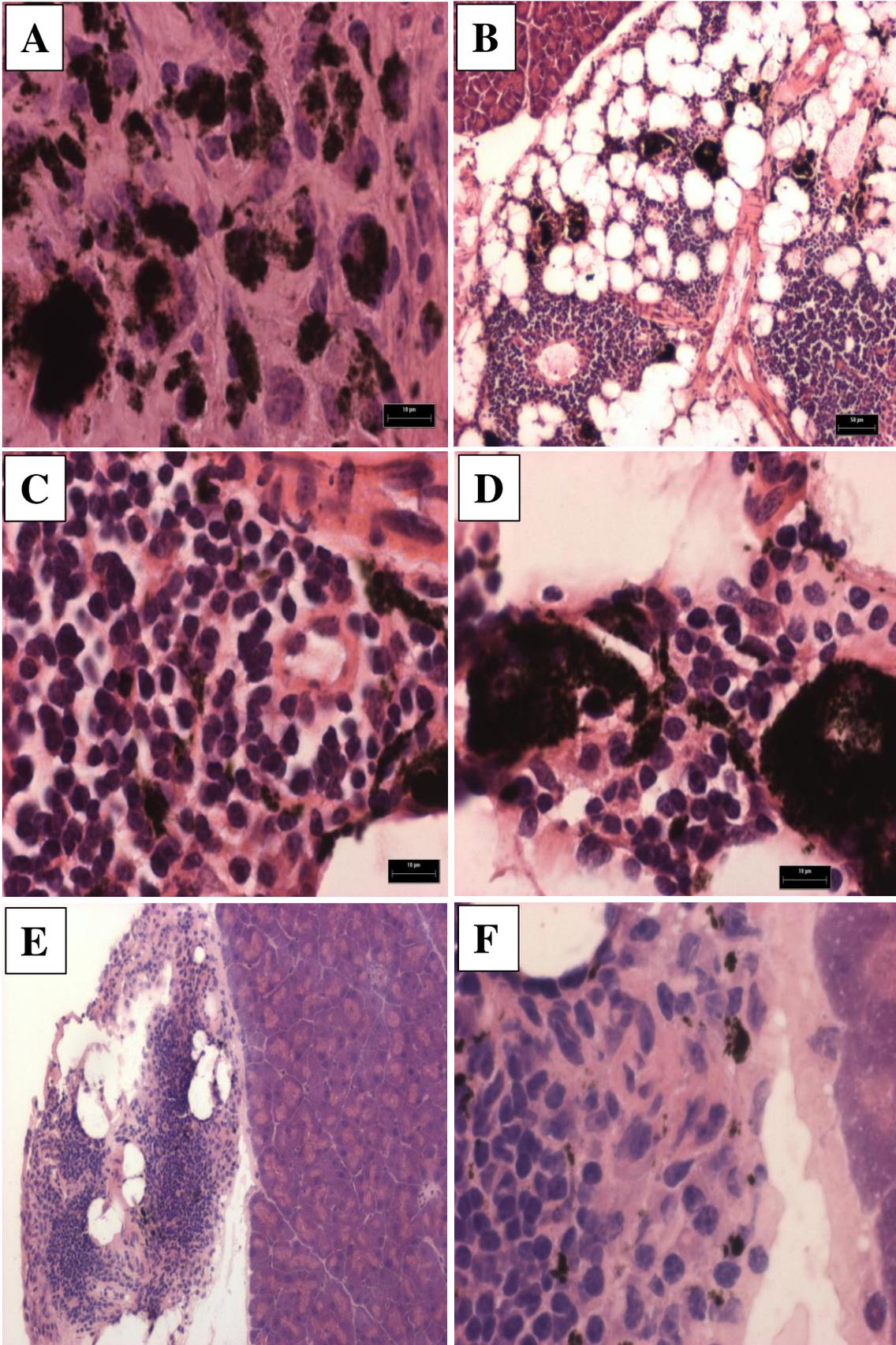


Figure 5 Histological sections (hematoxylin-eosin staining) of pancreatic lymph nodes of mice at 8 (A), 14 (B-D) and 24 weeks (E-F) post IP administration of MWCNT.

Magnification: x10 (B,E); x60 (A, C, D); x100 (F)

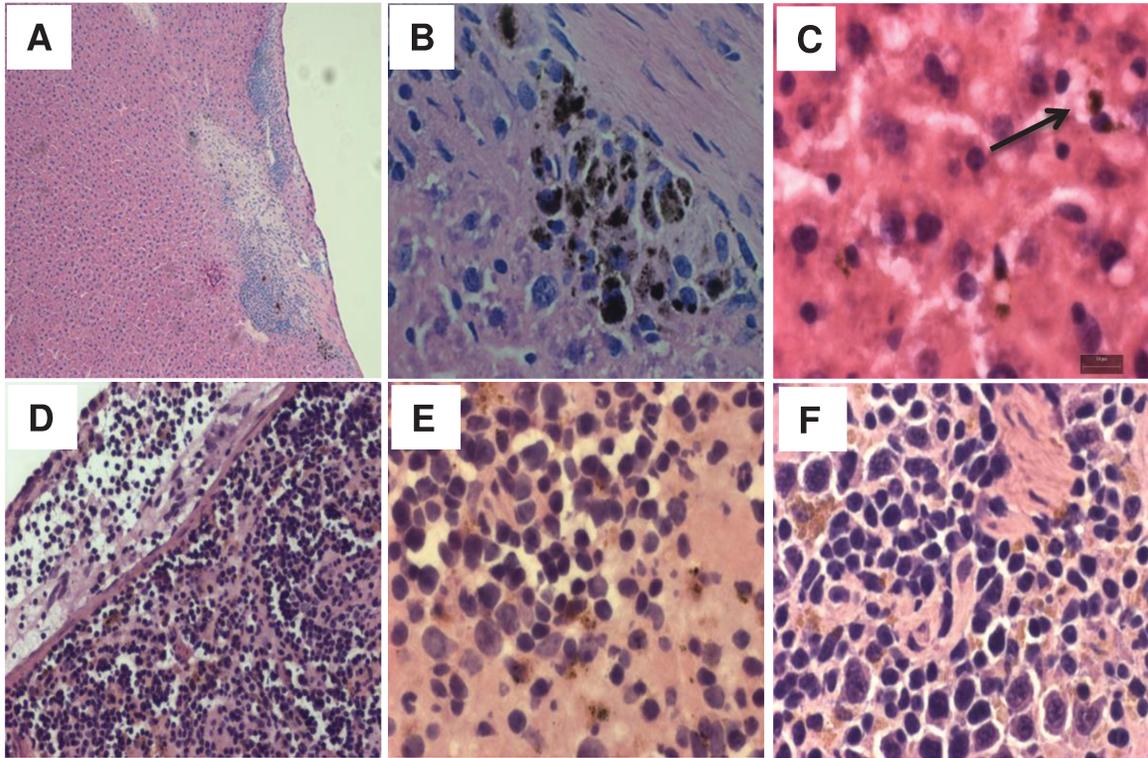


Figure 6 Histological sections of liver (A-C) and spleen (D-E) of mice at 24 weeks after ip administration of MWCNT.; control spleen (F). Magnification: x10 (A,D); x60 (B,C,E,F)

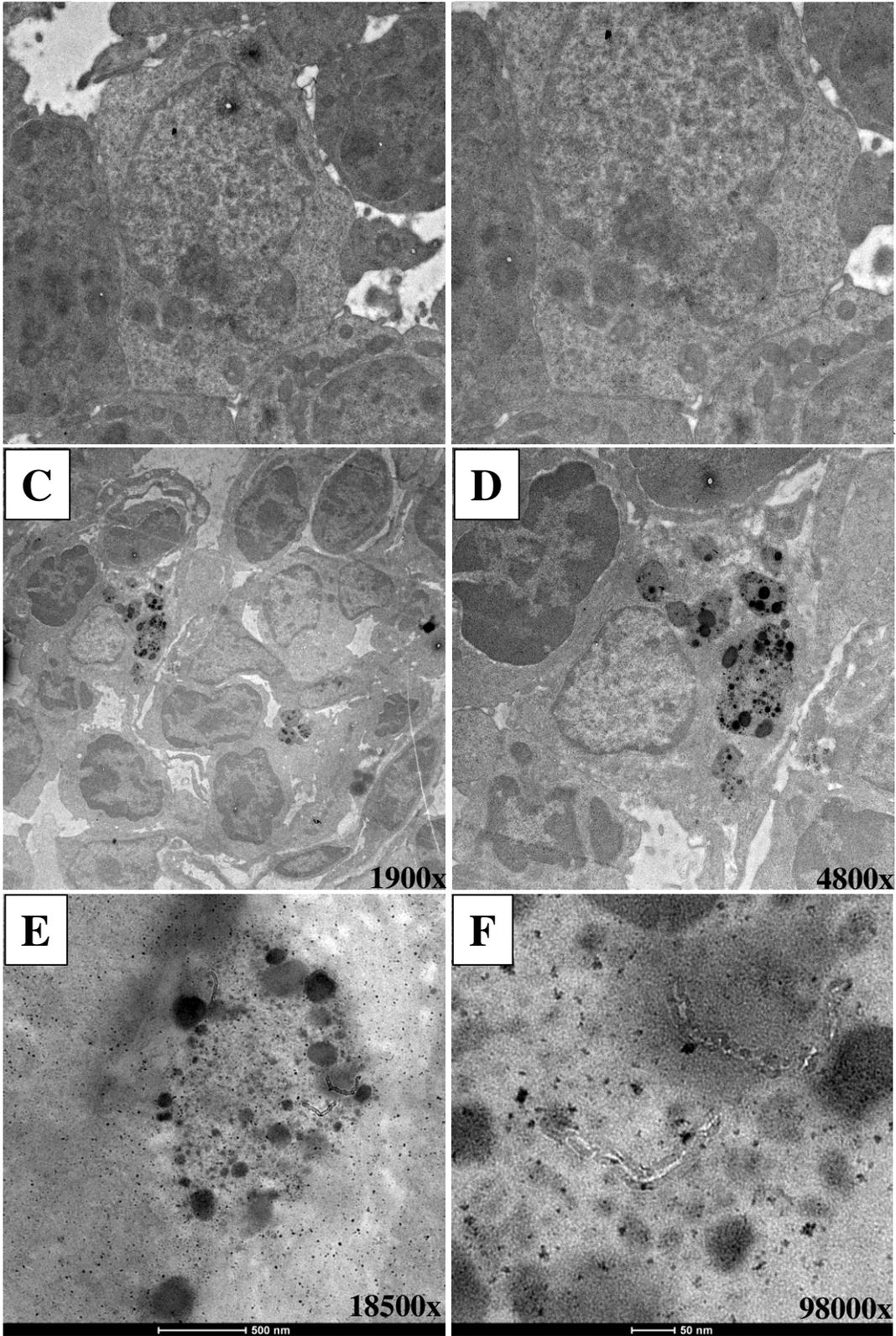


Figure 7 TEM images of pancreatic lymph nodes sections of control mouse (A,B) and MWCNT treated mouse at 8 weeks after administration (C-F). MWCNTs were identified within phagolysosomes of **macrophages**, as represented in the magnification (E,F) of the area seen in C-D images.

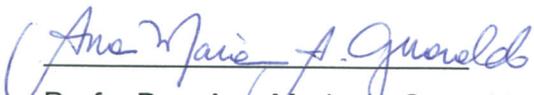
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

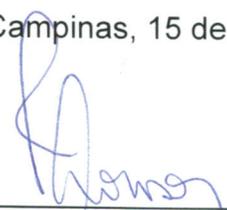
Certificamos que o projeto "**INTERVENÇÃO DO NANOTUBO DE CARBONO NO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES MELITO TIPO 1 ESPONTÂNEO DO CAMUNDONGO NOD ("NON OBESE DIABETIC")**" (protocolo nº **2503-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Vítor Baranauskas / Daniela Franchi Pereira da Silva Camilo**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **15 de agosto de 2011**.

Campinas, 15 de agosto de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva