



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Administração *in vivo* de Nanotubos de Carbono não funcionalizados na resposta de Linfócitos T e B

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

Ana Carolina Pimenta Grecco

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonilda M. B. dos Santos

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Elaine C. de Oliveira (FATEC/Sorocaba)

Dr. Helder José Ceragioli (FEEC/UNICAMP)

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (FEEC/UNICAMP)

Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Universidade Estadual de Campinas

2009

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

G799a Grecco, Ana Carolina Pimenta
Administração in vivo de nanotubos de carbono não funcionalizados na resposta de linfócitos T e B / Ana Carolina Pimenta Grecco. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Vitor Baranauskas, Leonilda Maria Barbosa dos Santos .
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Nanotubos de carbono. 2. Resposta imune. 3. Imunoglobulinas. I. Baranauskas, Vitor. II. Santos, Leonilda Maria Barbosa dos . III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: In vivo administration of non functionalized carbon nanoparticles on T and B lymphocytes response

Palavras-chave em Inglês: Carbon nanoparticles, T cells immune response, production of antibody

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Elaine Conceição de Oliveira, Helder José Ceragioli

Data da defesa: 30/01/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Ana Carolina Pimenta Grecco

Data da Defesa: 30 de janeiro de 2009

Título da Tese: "Administração In Vivo de Nanotubos de Carbono não Funcionalizados na Resposta de Linfócitos T e B"

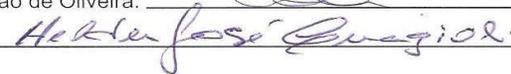
Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):



Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira:



Dr. Helder José Ceragioli:



Às pessoas mais importantes da minha vida: minha família e meu namorado Renato.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família: **Pai, Mãe, Fabio, Vó, Tia Ana, Tia Zezé e Tio Jorge**, pela paciência, dedicação, amor, confiança, incentivo e apoio.

Ao meu namorado **Renato**, por estar ao meu lado sempre, por me esperar, por acreditar e confiar em mim e por não me deixar esquecer que cada minuto vale a pena.

À minha amiga e parceira **Érika**, pelo apoio, amizade, e principalmente, pelo companheirismo que tornaram essa fase muito mais divertida e amena.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Vitor Baranauskas**, pela confiança e incentivo.

À minha co-orientadora **Prof^a Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, por me aceitar como aluna, pela sua disponibilidade, otimismo, apoio e incentivo.

Ao **Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz e Dr. Helder José Ceragioli** que sempre estiveram dispostos a ajudar.

À **Jaqueline e Giane**, secretárias da FEEC, pela atenção e por todo o auxílio.

A todos os amigos do LE-25: **Luiz, Indayara, Lídia, Mariana, Juliana, Jackson, Celso, Kleber, Hudson, Judson e Juvenil**, por todos os momentos de descontração e de ajuda mútua.

Aos amigos do Laboratório de Neuroimunologia: **Juliana, Gabi, Ana, Fernando, Ricardo e Rosanne**, por toda contribuição e por todas as horas de trabalho e diversão.

À **Rose, Elaine, Ana Leda e Alessandro**, por toda a paciência, por todos os ensinamentos, por toda a ajuda e pelos momentos agradáveis durante este ano.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia: **Alexandre, Gustavo, André, César, Raffinha e Karina**, pelo incentivo e apoio.

Ao **Luiz e José Raimundo** (Laboratório 5); **Marcos; Patrícia e Jaci** (Laboratório 3); e **Juvani** (Histologia), por todos os empréstimos e por todo o auxílio.

Ao **LNLS, ao Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro, ao CEBMEG e ao NanoEng**, pelos procedimentos metodológicos.

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

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

A aventura da vida é aprender

A natureza da vida é mudar

O objetivo da vida é crescer

O segredo da vida é ousar

O desafio da vida é superar

A alegria da vida é amar

Arthur Willian

Resumo

Os nanotubos de carbono estão sob intenso estudo diante da possibilidade de serem utilizados em aplicações biomédicas. Estudos prévios descreveram que a inalação de nanopartículas de carbono induz resposta inflamatória no tecido pulmonar; entretanto o efeito dessas partículas na resposta imune adaptativa não está completamente entendido. Assim, três diferentes preparações de nanotubos de carbono (NT1, NT4, NT5) foram testadas *in vivo* na resposta de linfócitos T e B de camundongos C57Bl/6. Os nanotubos de paredes múltiplas NT1 e NT4 foram produzidos em nosso laboratório e seu efeito na resposta imune adaptativa foi comparado com uma preparação comercial de nanotubos (NT5). A preparação (NT4) demonstrou alguns efeitos citotóxicos, sendo inadequada para uso *in vivo*. As outras preparações não mostraram toxicidade quando administradas sistemicamente. Os nanotubos NT1 e NT5 induziram a uma significativa ativação de linfócitos T e B. A administração sistêmica dessas estruturas resultou no aumento da resposta proliferativa de linfócitos ao mitógeno inespecífico Con A, no aumento da expressão de mRNA de citocinas como TNF α , IL-6, IL-10 e significativa redução do TGF β . As nanoestruturas induziram significativo aumento da produção de anticorpos específicos para ovalbumina. Esses resultados enfatizam a importância de estudar a resposta imune induzida pelas nanopartículas antes funcionalizá-las com proteínas, DNA ou utilizá-las na oferta de fármacos.

Palavras chaves: nanopartículas de carbono, resposta imune de células T, produção de anticorpos

Abstract

Carbon nanotubes are currently under scrutiny as new tools for biomedical applications. Previous studies have shown that inhalation of carbon nanoparticles elicited an inflammatory response in the lung tissue; however the effect of these particles in the adaptive arm of the immune response deserves more attention. Thus, three different preparations of carbon nanotubes (NT1, NT4, NT5) were tested on *in vivo* T and B lymphocytes response of C57Bl/6 mice. The multi-walled carbon nanotubes NT1 and NT4 were produced in our facilities and their effect on adaptive immune response was compared to commercial carbon nanotubes (NT5). The preparation (NT4) has demonstrated some cytotoxic effects and was inappropriate for use *in vivo*. No cytotoxicity was observed in the other preparations when administered systematically *in vivo*. Carbon nanotubes NT1 and NT5 lead to a significant activation of the T and B lymphocytes. The systemic administration of these structures resulted in increased proliferative response of lymphocytes to nonspecific mitogen ConA, augmented the mRNA cytokines expression such as TNF α , IL-6, IL-10 and significant decrease of TGF β . Nanostructures induced significant increase in the production of antibody to a specific antigen (OVA). These results emphasize the importance of studying the immune response induced by the nanoparticles before functionalizing them with proteins, DNA or for drug delivery purpose.

Key words: carbon nanoparticles, T cells immune response, production of antibody

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Resumo</i>	viii
<i>Abstract</i>	ix
<i>Índice de Figuras</i>	xii
<i>Índice de Tabela</i>	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanotecnologia.....	2
1.2 Nanomedicina.....	3
1.3 Nanotubos de Carbono.....	5
1.3.1 Técnicas de Obtenção de Nanotubos de Carbono.....	6
1.3.1.1 Deposição Química a partir da Fase Vapor – CVD.....	7
1.3.2 Técnicas de Caracterização de Nanotubos de Carbono.....	8
1.3.2.1 Espectroscopia Raman.....	8
1.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	9
1.4 Aplicações Biológicas.....	10
1.4.1 Possível Uso Terapêutico dos Nanotubos de Carbono.....	10
1.5 A Resposta Imunológica.....	12
1.6 Resposta auto-imune.....	16
1.7 Associação entre partículas inertes e doenças auto-imunes.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais.....	21
3.2 Nanotubos de Carbono.....	21
3.3 Administração dos nanotubos aos animais.....	22
3.4 Imunização com Ovalbumina (OVA).....	22
3.5 Quantificação de diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo.....	23
3.6 Resposta Linfoproliferativa.....	23
3.7 Expressão de mRNA das citocinas por RT-PCR quantitativo.....	24
3.8 Quantificação de anticorpos anti-OVA.....	25
3.9 Análises estatísticas.....	25

4.	RESULTADOS.....	26
4.1	Caracterização Raman e morfológica FESEM dos nanotubos de carbono.....	27
4.2	Resposta dos linfócitos T após a administração <i>in vivo</i> dos nanotubos de carbono por citometria de fluxo.....	29
4.3	Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA após a administração <i>in vivo</i> de nanotubos de carbono.....	30
4.4	Expressão gênica do mRNA das citocinas pelos linfócitos dos camundongos C57Bl/6 após a administração <i>in vivo</i> de nanotubos de carbono.....	32
4.5	Resposta de anticorpos a OVA após a administração <i>in vivo</i> de nanotubos de carbono.....	34
5.	DISCUSSÃO.....	35
6.	CONCLUSÕES.....	41
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectros típicos de Raman das amostras NT1 e NT4 assim que depositadas, e da amostra comercial NT5.....	27
Figura 2 (a,b,c,d). Imagens típicas de FESEM das amostras assim que depositadas em diferentes ampliações. (a-b) NT1 e (c-d) NT4.....	28
Figura 3. Relação de linfócitos T CD4/CD8 após a administração <i>in vivo</i> dos nanotubos de carbono.....	29
Figura 4. Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA após a administração <i>in vivo</i> de nanotubos de carbono. A resposta proliferativa foi avaliada pela incorporação de timidina H ³	31
Figura 5. Expressão gênica do mRNA de citocinas pelas células do baço após a administração sistêmica do nanotubo NT1. A expressão das citocinas foi avaliada 24 horas, 7 dias e 15 dias após a administração <i>in vivo</i> do NT1.....	33
Figura 6. Produção de anticorpos (IgG) anti-OVA por camundongos C57Bl/6 inoculados ou não com nanotubos de carbono.....	34

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Comparação entre as diferentes técnicas de obtenção dos nanotubos de carbono.....	6
--	---

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

A nanociência é uma das mais importantes áreas de pesquisa e desenvolvimento da ciência moderna. A palavra "nano" significa um bilionésimo do metro (10^{-9} m), e o nanômetro (nm) define a escala de comprimento que é utilizada para medir sistemas estudados em nanociência. No sentido mais simplista, nanociência é a ciência das pequenas partículas de materiais. Essas pequenas partículas são interessantes a partir de uma perspectiva fundamental: as propriedades de um material, tal como o seu ponto de fusão, e as suas propriedades eletrônicas e ópticas, mudam quando o tamanho das partículas que compõem o material é nanométrico. Com novas propriedades, vêm novas oportunidades de desenvolvimento tecnológico e comercial, e as aplicações das nanopartículas têm sido mostradas ou propostas em áreas diversas como microeletrônica, revestimentos, biotecnologia e nanotecnologia [1].

A nanotecnologia é uma nova ciência multidisciplinar que envolve aplicações baseadas na síntese de moléculas na escala nanométrica [2]. Este salto tecnológico no controle de materiais em escala nanométrica, na última década, impulsionou o uso de nanodispositivos, tais como as nanopartículas, com aplicações que vão desde eletrônicos e comunicações, até a óptica, química, energia, e evidentemente biologia [3].

Os nanomateriais podem ser metais, cerâmicos, polímeros, ou materiais compósitos que demonstrem novas propriedades, em comparação com materiais convencionais, devido as suas características. Ao longo das últimas duas décadas, os nanomateriais têm atraído grande interesse do governo, empresas privadas e pesquisadores acadêmicos. A crescente exploração da nanotecnologia resultou na identificação de muitas propriedades únicas dos nanomateriais, como reforço magnético, propriedades catalíticas, ópticas, elétricas e mecânicas, quando comparados a formulações convencionais do mesmo material [4].

As propriedades únicas dos nanomateriais combinadas com a capacidade notável de reconhecimento de biomoléculas podem gerar novos tecidos, biosensores eletrônicos,

sistemas de diagnóstico sensíveis e sistemas de administração controlada de medicamentos com desempenhos significativamente maiores [4].

Os nanomateriais de carbono são indiscutivelmente os produtos mais interessantes da nanotecnologia, englobando fulerenos, nanotubos, nanofibras, e uma grande variedade de formas conexas. Além dessas formas, existem nanorevestimentos, nanofilmes, superfícies nanoestruturadas criadas por inúmeras modificações técnicas que também são amplamente exploradas para aplicações biomédicas [4]. Esses nanomateriais podem entrar no organismo vivo através da inalação, via cutânea (pele), ingestão ou injeção intencional, e podem afetar microorganismos, plantas e animais se forem liberados no ambiente em quantidades significativas.

Assim, é cada vez mais reconhecido que o desenvolvimento de novos nanomateriais deve ser acompanhado de esforços paralelos para investigar e entender os seus potenciais efeitos à saúde e ao ambiente. A pequena dimensão e a elevada área superficial dos nanomateriais podem induzir mudanças na permeabilidade ou na condutividade das membranas biológicas, facilitar a sua penetração no pulmão, ou aumentar a captação celular levando a citotoxicidade do nanomaterial por si só a partir de espécies adsorvidas transportadas dentro da célula durante a endocitose [5].

1.2 NANOMEDICINA

Desta forma, o interesse crescente em aplicações da nanotecnologia à medicina levou ao aparecimento de um novo campo chamado nanomedicina, que engloba diversas aplicações de nanomateriais e nanodispositivos para fins diagnósticos e terapêuticos em áreas como radiologia, administração de medicamentos e regeneração tecidual; para ganhar uma maior compreensão dos complexos mecanismos subjacentes às doenças; e para o desenvolvimento de novos produtos médicos. Mais amplamente, a nanomedicina é o processo de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e lesões traumáticas; além da prevenção e melhoria da saúde humana; da manipulação e controle dos processos

biológicos utilizando ferramentas moleculares e conhecimento molecular do corpo humano. Em suma, nanomedicina é a aplicação da nanotecnologia à medicina [6].

A promessa que a nanotecnologia traz é multifacetada, oferecendo não só melhorias para técnicas atuais, mas também fornecendo novas ferramentas e capacidades. Pela manipulação de drogas e outros materiais na escala nanométrica, as propriedades fundamentais e a bioatividade dos materiais podem ser alteradas. Estas ferramentas podem permitir um controle sobre as características das drogas ou agentes, tais como solubilidade, liberação controlada de curta ou longa duração, entre outras [7].

Os analistas prevêem que o mercado de nanobiotecnologia vai ultrapassar US\$ 3 bilhões, refletindo uma taxa de crescimento anual de 28% [8]. De acordo com outro estudo recente, a demanda dos Estados Unidos relacionada com a nanotecnologia para produtos médicos (nanodiagnósticos, nanodispositivos, e suprimentos médicos baseados em nanotecnologia) aumentará mais de 17% ao ano para US\$ 53 bilhões em 2011 e US\$ 110 bilhões em 2016 [9]. Este relatório prevê que o maior impacto em curto prazo da nanomedicina será em terapias e diagnósticos de câncer e doenças do sistema nervoso central.

Obviamente, nem todas as tentativas para aplicar novas abordagens da nanotecnologia na medicina têm alcançado o sucesso esperado. Diferentes estruturas nanométricas não se comportam da mesma maneira, e pequenas interações moleculares ocorrem. Nanoestruturas, especialmente as multifuncionais, são complexos objetos tridimensionais com dependência crítica de posição, tamanho, forma e carga dos componentes interligados [7].

De fato, materiais e dispositivos de dimensões nanométricas já estão aprovados para uso clínico e numerosos produtos são avaliados em ensaios clínicos [10]. No entanto, ainda existem as preocupações toxicológicas e as questões éticas que acompanham a nanomedicina que podem, eventualmente, prejudicar o futuro promissor deste campo emergente.

1.3 NANOTUBOS DE CARBONO (NT)

Os NTs foram descobertos por Iijima no ano de 1991, desencadearam uma avalanche de pesquisas e abriram caminho para um novo ramo da ciência do carbono. Nanotubos de carbono consistem exclusivamente de átomos de carbono dispostos em uma série de anéis benzeno laminados em uma estrutura tubular. Este novo nanomaterial pertence à família dos fulerenos, a terceira forma alotrópica de carbono, juntamente com grafite e diamante. NTs podem ser classificados em duas categorias gerais, com base na sua estrutura: paredes simples (*single-walled nanotube*, SWNT), que são constituídos por uma única camada cilíndrica de grafeno; e paredes múltiplas (*multi-walled nanotube*, MWNT), que contêm várias folhas de grafeno concêntricas. NTs têm dimensões nanométricas: SWNT têm diâmetros entre 0,4 a 2,0 nm e comprimentos na faixa de 20-1000 nm, enquanto MWNT são maiores, com diâmetros na ordem dos 1,4-100 nm e comprimentos de 1 a vários micrômetros [11-12].

Os NTs têm propriedades físico-químicas muito interessantes, tais como: estrutura ordenada com alta relação entre eixos, peso ultraleve, alta resistência mecânica, alta condutividade elétrica, alta condutividade térmica, comportamento metálico ou semi-metálico e elevada área superficial. A combinação destas características torna o NT um material único com potencial para diversas aplicações, inclusive biomédicas [11].

Existe um interesse crescente em explorar todas estas propriedades que os NTs possuem para aplicações diversas, incluindo reforços em materiais poliméricos existentes para melhorar as propriedades mecânicas e criar nanocompósitos [13-14]. Eles também podem ser usados para criar polímeros condutores elétricos e substratos para engenharia de tecidos com a capacidade de fornecer estimulação elétrica controlada [15-17]. Ainda, nanocarbonos são utilizados no reforço estrutural de aeronaves, dispositivos ópticos, lubrificantes moleculares, supercondutores, fios elétricos, protetores biológicos (por exemplo, protetor solar) e biosensores para a detecção de anomalias genéticas ou moleculares; bem como sistemas de distribuição para uma variedade de agentes diagnósticos ou terapêuticos [1;18]

1.3.1 Técnicas de obtenção de nanotubos de carbono

Os MWNTs foram descobertos na fuligem do método de descarga por arco elétrico por Iijima [19]. Este método já era usado há muito tempo na produção de fibras de carbono e fulerenos. Iijima e Ichihashi [20], e Bethune *et al.* [21] levaram dois anos até sintetizar SWNTs pelo uso de metais catalíticos no método de descarga por arco elétrico em 1993. Um progresso significativo foi alcançado pela síntese por ablação a laser de bandas de SWNTs alinhadas com pequeno diâmetro por Smalley *et al.* em 1996 [22]. O crescimento catalítico de nanotubos pelo método de deposição química da fase vapor (*Chemical Vapor Deposition*, CVD) foi usado pela primeira vez por Yacaman *et al.* em 1993 [23].

Método	Descarga por arco	CVD	Ablação a laser
Vantagens	Fácil produção de MWNT e SWNT. SWNT produzido com poucos defeitos. MWNT produzido sem catalisador. Barato.	Fácil produção em larga escala. Tubos grandes. Crescimento e deposição alinhados. Diâmetro dos NT controlável ajustando os parâmetros de deposição. Barato.	Principalmente, produção de SWNT. Bom controle do diâmetro e poucos defeitos. Produto bastante puro.
Desvantagens	Tubos tendem a ser curtos. Difícil controle das características dos tubos. Necessidade de purificação	Necessidade de catalisador.	Difícil produção em larga escala. Caro.

Tabela 1. Comparação entre as diferentes técnicas de obtenção dos nanotubos de carbono.

Como a técnica CVD foi escolhida para o crescimento do material deste estudo, ela será considerada separadamente.

1.3.1.1 Deposição química a partir da fase vapor – CVD

A produção de NTs por CVD consiste na decomposição química de precursores voláteis e solventes, tais como metano e acetileno, através de um tratamento térmico adequado. Os gases aí atuam como “fornecedores” de átomos de carbono que alimentam a reação responsável pela geração dos NTs. Essa reação é desencadeada por um catalisador que provoca a decomposição do hidrocarboneto precursor em átomos de carbono e hidrogênio. Os primeiros depositam-se sobre um substrato, enquanto os últimos são eliminados por exaustão. Por envolver uma reação de decomposição de compostos moleculares por aquecimento, essa técnica é muitas vezes chamada de pirólise.

Os parâmetros mais importantes na deposição por CVD são o gás, o tipo de catalisador, a temperatura do substrato sobre o qual se deseja crescer NTs, entre outros. O tipo de substrato, por exemplo, também desempenha um papel importante na geração de NTs, já que tem sido verificado que a escolha do substrato influencia consideravelmente o crescimento dessas estruturas [24-25].

Normalmente, para se obter NTs por CVD, são usados como precursores metano ou acetileno. Assim como nas demais técnicas, vários tipos de catalisadores têm sido experimentados com o intuito de se otimizar o processo, tais como Ni, Fe, Co e Y. Temperaturas típicas usadas em CVD estão entre 500 e 700 °C, mas é possível encontrar trabalhos em que foram gerados NTs a temperaturas acima de 1000 °C [24].

O método de CVD também é atraente por não gerar estruturas amorfas de carbono juntamente com os NTs, ou seja, o material produzido por esse método é limpo, diferentemente, por exemplo, daquele gerado por descarga elétrica. Isso é decorrência do maior controle que se tem sobre as variáveis do processo de CVD, tais como temperatura do gás, temperatura do substrato e concentração do precursor.

Uma outra vantagem dessa técnica é que, por sua própria natureza e geometria, ela permite conhecer o sentido de crescimento dos NTs, o que, do ponto de vista científico, é muito importante para a compreensão do processo. Por outro lado, assim como as demais técnicas, essa também tem seus problemas. A estrutura dos MWNTs gerados por CVD, por exemplo, apresenta defeitos. Segundo H. Dai [26], é provável que isso ocorra devido às baixas temperaturas usadas, as quais não permitem que os NTs se cristalizem de modo perfeito. De fato, já se conseguiu crescer SWNTs quase livres de defeitos por CVD, aquecendo-se o substrato a temperaturas próximas de 1000 °C [24]. Altas temperaturas, por outro lado, podem constituir um fator limitante no uso desta técnica.

1.3.2 Técnicas de caracterização de nanotubos de carbono

É importante notar que nenhuma técnica analítica é capaz de definir a pureza de uma amostra de NT. Normalmente, amostras de NT de fontes comerciais são acompanhadas por espectros Raman, análise elementar de dados, e microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou transmissão (MET) [27].

1.3.2.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman baseia-se na análise do espectro produzido pelo fenômeno de dispersão da luz quando esta interage com a matéria. Essa dispersão pode ser interpretada como um processo de colisão com troca de energia entre fótons e átomos, moléculas e íons que formam o meio material. Da mesma forma que as colisões, os processos de espalhamento de luz podem ser dos tipos elástico e inelástico, caso haja ou não transferência de energia entre a radiação e o meio. Assim, parte da luz espalhada deve ter a mesma frequência da luz incidente (processo denominado de espalhamento Rayleigh) e parte deve possuir frequências diferentes (fenômeno chamado de espalhamento Raman). Para que a energia total do sistema se conserve, a uma variação na frequência da luz espalhada deve corresponder uma mudança na quantidade de energia do meio. Essas transferências de energia ocorrem através da absorção da radiação incidente que faz com que as moléculas do material saltem de um nível energético a outro. Dessa forma, a

quantidade de energia perdida ou ganha em uma transição entre níveis energéticos, ou seja, a diferença de energia entre dois níveis, deve ser idêntica àquela correspondente à variação na frequência da radiação inelasticamente espalhada. Observa-se então que o espalhamento Raman fornece informações sobre a estrutura do meio material através do seu espectro [28].

1.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica é um método de análise através de imagens que são geradas ao se “iluminar” uma amostra com um feixe de elétrons. É um método similar à microscopia óptica, exceto pelo fato de que os fótons são substituídos por elétrons. Como estes últimos possuem um comprimento de onda menor que o dos fótons, a resolução que se pode obter é muito maior. Os elétrons, ao interagirem com uma amostra, podem ter suas trajetórias mudadas ou por reflexão ou por transmissão. A formação de imagens a partir dos elétrons espalhados por reflexão constitui o que se chama de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que recebe esse nome porque, nessa técnica, deve-se fazer um feixe de elétrons de diâmetro da ordem de nanômetros percorrer, em linhas paralelas, toda a superfície da amostra que se quer “micrografar”. Os elétrons espalhados em cada ponto da superfície em questão são capturados por um detector fixo, sendo a informação aí contida armazenada na forma de uma imagem [29].

Apesar da inexistência de uma técnica que comprove a pureza do nanomaterial, as técnicas de caracterização dos NTs são extremamente importantes para auxiliar na identificação e na escolha do NT para utilizações em diversas áreas, incluindo a biológica [27].

1.4 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

1.4.1 Possível uso terapêutico dos nanotubos de carbono

Nas últimas duas décadas, uma série de partículas em nanoescala foi desenvolvida para o uso terapêutico. Uma propriedade interessante e muito útil dos NTs é sua capacidade de penetrar nas membranas celulares, proporcionando uma rota de entrega de cargas para o citoplasma e, em muitos casos, para o núcleo das células [30]. O mecanismo pelo qual isso ocorre não é bem entendido, mas pode ser mediado por endocitose [30] ou inserção direta dos nanotubos (ou seja, como “*microneedles*”) através de membranas celulares [31]. Portanto, NTs têm sido estudados para entrega intracelular de proteínas e peptídeos, fármacos (*drug delivery*); ressonância magnética ou agentes de contraste de fluorescência; e DNA, bem como no desenvolvimento de vacinas [1;32].

Uma consideração chave no uso de NTs para aplicações *in vivo* é a sua insolubilidade em água; essa propriedade pode ser responsável pela sua toxicidade contra células vivas [33-34]. Então, a incorporação de NTs em sistemas vivos torna-se preocupante porque este tipo de nanomaterial poderia acumular em células, órgãos e tecidos com efeitos colaterais desconhecidos [34-35].

Dessa forma, ao avaliar as potencialidades de nanopartículas para aplicações *in vivo*, a toxicidade é um fator crucial a considerar. Apenas alguns estudos avaliaram os riscos associados à exposição a nanopartículas e os resultados têm sido inconclusivos. Sugere-se que as nanopartículas afetam o comportamento biológico nos níveis celular, subcelular, protéico e genético [3].

Em contrapartida, outros autores indicaram que as nanopartículas são materiais biologicamente inertes e, portanto, adequados para aplicações *in vivo*. Em apoio a esta hipótese, vários estudos têm demonstrado que as nanopartículas injetadas em animais vivos não produziram efeitos tóxicos detectáveis [36-38].

Em meio a esta controvérsia, a nanotoxicologia emergiu como a disciplina que tem como objetivo investigar a segurança das nanotecnologias. Especificamente, a nanotoxicologia tem como objetivo avaliar os riscos associados à exposição a nanomateriais, explorar as vias de entrada de nanopartículas no organismo e estudar os mecanismos moleculares de toxicidade das nanopartículas [39-40]. Hoje em dia, muitas questões aguardam resolução no campo da nanotoxicologia. Estudos realizados para identificar as bases moleculares para toxicidade induzida por nanopartículas demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ERO) têm um papel fundamental [41]. No entanto, os mecanismos precisos responsáveis pela geração do dano oxidativo, e a identidade das moléculas envolvidas ainda são pouco claros.

Atualmente, sabe-se que o pequeno tamanho das nanopartículas implica em uma elevada área superficial. No entanto, isto não significa necessariamente que eles deveriam possuir maior reatividade no ambiente celular ou ter potencial aumentado para toxicidade.

De fato, a toxicidade associada à nanopartícula se deve a possibilidade de deposição e acúmulo destas partículas em órgãos específicos, o que poderia provocar alterações intracelulares, que afetariam a integridade celular e, portanto, a função do órgão. Neste contexto, os estudos realizados em animais mostraram que as nanopartículas alcançam a corrente sanguínea e podem causar reações inflamatórias nos pulmões [42]. O acúmulo de nanopartículas também foi observado no fígado, no baço, linfonodos e medula óssea [38;43-44]. Na tentativa de controlar e minimizar os efeitos indesejáveis das nanopartículas, as abordagens químicas, tais como o tratamento da superfície, a adição de grupos funcionais e formação de compósitos são aplicadas para projetar nanopartículas.

Vale ressaltar que algumas nanopartículas têm propriedades terapêuticas intrínsecas próprias. Neste contexto, deve-se considerar que cada propriedade da nanopartícula (ou seja, tamanho pequeno, grande área superficial, composição química, solubilidade e geometria) determina a resposta biológica [3].

A crescente utilização de NTs com o objetivo de melhorar a qualidades e o desempenho de diversos produtos, inclusive em possíveis aplicações na área biomédica, provavelmente aumentará drasticamente a exposição ocupacional e comercial a nanomateriais de carbono em um futuro próximo [45]. É, portanto, imperativo que a investigação toxicológica para avaliar a biocompatibilidade e eventuais efeitos negativos sobre a saúde das pessoas e do ambiente seja realizada concomitantemente com pesquisa e desenvolvimento tecnológico em nanomateriais [39;46-47].

Infelizmente, as informações relativas aos perigos potenciais relacionados com a exposição a NT são raras e ainda em debate. A comunidade científica está preocupada principalmente com a toxicidade dos NTs devido à sua semelhança estrutural com asbesto [48].

Dessa forma, o efeito de nanotubos de carbono não-funcionalizados na biocompatibilidade e na resposta imune merece mais atenção, já que o sistema imune pode ser potencialmente ativado por qualquer substância externa que penetre no organismo.

1.5 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O desafio da convivência com os microrganismos certamente representou uma pressão evolutiva importante na modelagem do sistema imunológico na defesa contra organismos potencialmente patogênicos para os organismos superiores. No entanto, essa não é a única função do sistema imunológico, a remoção de células senescentes, a participação nas interações neuroendócrinas, a rejeição aos transplantes e a vigilância contra o aparecimento das células tumorais são funções exercidas, com igual importância, pelo sistema imune.

Não perdendo de vista a complexidade das interações existentes no sistema imune, didaticamente, pode-se dividir os mecanismos de resposta imunológica em dois grupos principais: os mecanismos da resposta imune inata e adquirida.

Na resposta imune inata, o conjunto de elementos tem condições de responder aos antígenos de forma não específica, não envolvendo os receptores com regiões variáveis. Dessa resposta participam principalmente as proteínas do sistema complemento, os receptores *Toll like*, as células *natural killer* (NK), os granulócitos e as células do sistema fagocítico-monocitário.

Entende-se por imunidade adquirida, a atuação de um conjunto de elementos que permite uma resposta específica, devido principalmente à diversidade das populações de linfócitos T e B, caracterizadas por seus receptores, que são moléculas com regiões variáveis para o reconhecimento do antígeno, geradas pela recombinação gênica [49].

O conhecimento atual sobre o reconhecimento do antígeno pelas células T é o resultado de décadas de estudos, que tiveram início com o entendimento das características físico-químicas dos antígenos que estimulam a resposta imune adquirida. A especificidade dos linfócitos T para o antígeno (peptídeo) apresenta várias características de reconhecimento, que difere fundamentalmente do reconhecimento do antígeno pelas moléculas de anticorpos [49].

Enquanto as células B reconhecem como antígeno, os peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e pequenos produtos químicos, os linfócitos T reconhecem apenas os peptídeos dispostos numa seqüência primária de aminoácidos. Um aspecto fundamental do reconhecimento do antígeno pelas células T CD4 ou *helper* ou pelas T CD8 ou células citotóxicas é que os linfócitos T reconhecem o peptídeo apenas quando o mesmo está unido a uma forma alélica das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do próprio indivíduo, expressa na superfície das células apresentadoras do antígeno [50]. As células apresentadoras do antígeno (macrófagos, linfócitos B e as células dendríticas) convertem antígenos protéicos em peptídeos acoplando-os às moléculas MHC, mecanismo conhecido por processamento do antígeno.

O complexo formado pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e peptídeo no interior das células apresentadoras do antígeno

migra para a superfície celular onde podem ser reconhecidos pelos linfócitos T CD4 ou CD8, dependendo do alelo de MHC ao qual o peptídeo está acoplado. Essa interação é conhecida como o primeiro sinal indispensável para a ativação dos linfócitos T. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas células apresentadoras do antígeno.

As moléculas co-estimulatórias mais estudadas na atualidade são CD28 e CD152 (CTLA4) expressas nos linfócitos, que se ligam às moléculas CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras do antígeno [51]. A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como anergia. Há concordância na literatura que o sinal dado pela molécula CD28 influencia positivamente a ativação linfocitária, enquanto o sinal dado pela molécula co-estimulatória CTLA4 (CD152) é negativo na ativação de linfócitos [52]. A evidência mais importante da função inibidora da molécula CTLA4 veio de experimentos realizados em camundongos. Camundongos deficientes geneticamente para a molécula CTLA4 desenvolveram uma desordem linfoproliferativa fatal. Essas evidências mostraram que a molécula CTLA4 regula negativamente, de forma crucial, a ativação linfocitária [53] através da estimulação da produção de citocinas com efeito anti-inflamatório como a IL-10 e o TGF β [54].

Na seqüência de eventos que vão culminar com a ativação linfocitária, a participação dos produtos celulares solúveis é fundamental. As células T CD4 secretam certos tipos de citocinas que as diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th1 e Th2. Mais recentemente, um terceiro subtipo foi descrito, os linfócitos T *helper* 17.

Os linfócitos T CD4, do tipo Th1, secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN γ e TNF α que medeiam as reações de hipersensibilidade tardia (DTH) e induzem a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. As células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgG1 e IgE [55]. As células Th0 produzem um padrão combinado de citocinas Th1 e Th2, enquanto o subtipo designado Th3, identificado na mucosa intestinal, produz quantidades consideráveis de fator transformador de proliferação (TGF β) [56].

Vários fatores, incluindo a dose do antígeno, tipo de células apresentadoras de antígeno, a presença de moléculas co-estimuladoras e as citocinas presentes no microambiente, influenciam a diferenciação do subtipo Th1 em subtipo Th2. Há evidências de que as citocinas IL-12 e IFN γ , presentes no microambiente onde a resposta imune está acontecendo, induzem a diferenciação do tipo Th1, enquanto a IL-4 é essencial para a diferenciação das células do tipo Th2 [57].

As subpopulações Th1 e Th2 regulam-se mutuamente; o balanço entre elas determina a natureza da resposta imune nas infecções, e fortes evidências mostram que desempenham um papel crucial em termos de suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento das doenças auto-imunes [58].

As células Th1 são altamente pró-inflamatórias e estão ligadas com a indução e progressão de várias doenças auto-imunes. No entanto, a ausência da sinalização por IFN γ em camundongos KO para IFN γ ou ainda o receptor para IFN γ não conferiu resistência às doenças auto-imunes, pelo contrário, esses animais ficaram mais suscetíveis à indução das doenças [59-61]. Essas observações sugeriram a existência de um subtipo adicional de linfócitos T, distintos daqueles produtores de IFN γ , e que também são capazes de induzir inflamação e auto-imunidade. Esses estudos levaram a identificação dos linfócitos T produtores de IL-17 ou Th17 [62].

Colocados de uma forma simplista, os mecanismos citados garantem que o sistema imunológico atue, de forma eficiente, contra as diferentes agressões causadas pelos microorganismos ou qualquer outro tipo de antígeno. No entanto, devido à grande diversidade do repertório imunológico, esses componentes podem vir a agredir os componentes do próprio organismo.

1.6 Resposta auto-imune

No início do século XX foi introduzido o termo auto-imunidade para descrever que os potentes mecanismos efetores utilizados na defesa do hospedeiro podem, se voltados contra ele, levar a grave lesão tecidual. Essas agressões, no entanto, são verificadas apenas em condições patológicas, graças aos mecanismos de tolerância imunológica.

Tolerância imunológica pode ser entendida como a não resposta imune específica para um determinado tipo de antígeno. A tolerância aos auto-antígenos é ativamente conseguida e os linfócitos, tanto B como T, potencialmente auto-reativos são, de certa forma, inativados. Normalmente esse processo de inativação das células potencialmente auto-reativas ocorre durante a maturação celular, que acontece no timo, para as células T e na medula óssea para os linfócitos B. Os antígenos encontrados nesses órgãos linfóides primários são normalmente antígenos próprios. Assim, os linfócitos, nessa etapa de maturação, encontrarão apenas os antígenos próprios, associados às moléculas de MHC, tornando-se tolerantes, num processo conhecido como tolerância central. A tolerância central, no entanto, não garante que as células que deixam os órgãos linfóides primários e vão popular os órgãos linfóides secundários, não atuem como células auto-reativas. Assim, a auto-imunidade pode ser entendida como um processo fisiológico normal, no qual o organismo convive com as células e os anticorpos potencialmente auto-reativos, sem necessariamente desenvolver doenças auto-imunes [63-64].

As doenças auto-imunes surgem quando há anormalidade nos mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância periférica. Como a tolerância imunológica é uma não resposta imune específica, os mecanismos de tolerância são obtidos quando há favorecimento para a não ativação tanto dos linfócitos B, como os linfócitos T específicos para o auto-antígeno. Dentre os fatores que contribuem para a não ativação dos linfócitos T aos antígenos próprios, estão: a deleção dos clones auto-reativos, a indução de anergia e o desvio da resposta imune, causado pela polarização da produção de determinadas citocinas.

1.7 Associação entre partículas inertes e doenças auto-imunes

A associação entre doenças auto-imunes (artrite reumatóide, esclerodermia e lúpus eritematoso sistêmico) e exposição ocupacional a sílica cristalina foi examinada em vários estudos e revisada em Parks et al. [65], porém os mecanismos imunológicos responsáveis por essa associação ainda permanecem obscuros.

Estudos de partículas poluentes atmosféricas indicam que partículas de sílica estimulam uma resposta Th1, com aumento da produção de IFN γ e do subtipo de imunoglobulina IgG2a [66]. A sílica também reage com água para formar radicais hidroxila que reagem com as membranas celulares, resultando na peroxidação lipídica e produção suplementar de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem ativar os fatores de transcrição e aumentar a produção de citocinas. Esta inclinação para uma resposta Th1 e liberação de ERO promove a secreção continuada de citocinas pró-inflamatórias, resultando em ativação crônica dos macrófagos [67].

A exemplo do que acontece com a sílica, os nanotubos de carbono não são apresentados diretamente aos linfócitos T. Ao invés disso, são capazes de ativar os macrófagos e desencadear a via de sinalização celular iniciando a liberação de citocinas.

Diante disto, o presente trabalho tem como objetivo verificar como a ativação dos macrófagos pela interiorização dos nanotubos de carbono pode influenciar a resposta imune adquirida.

2. OBJETIVOS

Estudar o efeito da administração *in vivo* de nanotubos de carbono não-funcionalizados na resposta imune adaptativa.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da administração sistêmica dos nanotubos de carbono na resposta de linfócitos T. Essa resposta é mensurada pela quantificação de linfócitos T CD4 e CD8, pela resposta proliferativa de linfócitos estimulados por ConA e expressão do mRNA de citocinas.

Avaliar a função dos linfócitos B através da quantificação de anticorpos específicos contra a ovalbumina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 de 6 a 8 semanas de idade foram adquiridos no The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine-USA) e atualmente são estabelecidos como uma colônia no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Foram mantidos em condições livres de patógenos em micro-isoladores no biotério do Depto. de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os animais experimentais tiveram alimento e água *at libitum*, num ambiente com temperatura variável entre 21° e 23°C com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram separados por idade para cada experimento e distribuídos randomicamente em grupos controle e experimento. Todos os procedimentos foram realizados segundo as normas propostas pelo Comitê Brasileiro de Proteção Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP).

3.2 Nanotubos de carbono

Os diferentes tipos de amostras de NTs foram denominados NT1, NT4 e NT5. O tipo NT5 são nanotubos de carbono de paredes múltiplas com 95% de pureza adquiridos da NanoKorea Co. Os outros (NT1 e NT4) foram preparados pelo processo de deposição química da fase vapor assistida por filamento quente (*hot-filament chemical vapor deposition*, HFCVD) de átomos de carbono provenientes de diferentes fontes no laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng) do Depto. de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP.

Lâminas de cobre polidas de dimensões 10 mm x 10 mm e 0,5 mm de espessura foram utilizadas como substratos. Esses substratos foram recobertos com uma solução de polianilina, sem rotação, e posteriormente secos em uma placa quente em ambiente a 373 K por 120 minutos, e foram umedecidos com 0,2 ml de nitrato de níquel diluído em propanona (acetona) (10 g^l⁻¹). Todos os substratos foram imersos por 30 minutos na câmara de reação do sistema de HFCVD, alimentado com vapor de cânfora diluída em propanona

(20 gl^{-1}) (NT1) ou dimetil benzeno (xilol) (NT4). Os gases transportadores utilizados na câmara de reação foram hidrogênio 14,5% volume e nitrogênio 85% volume para a amostra NT1. Nas amostras NT4, utilizou-se hidrogênio 34,5% volume e argônio 65% volume. Uma pressão total de aproximadamente 20 Torr e um fluxo total de 100 sccm foram mantidos ao longo do processo. A temperatura, medida por um termopar colocado na parte inferior dos substratos de cobre, foi mantida em 723 K.

As análises morfológicas das amostras foram feitas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (do inglês, *Field Emission Scanning Electron Microscope*, FESEM) usando um JEOL JSM-6330F operando em 5 kV, 8 μA no LNLS. Os espectros Raman foram obtidos na temperatura ambiente com um sistema de microponta da Renishaw, usando um laser de Argônio no comprimento de onda de ($\lambda=514,5$ nm) com uma potência de laser de aproximadamente 6 mW localizado no NanoEng.

3.3 Administração dos nanotubos aos animais

Os nanotubos de carbono são extremamente difíceis de dispersar até na presença do agente dispersante. Para estudos *in vivo*, os nanotubos de carbono foram esterilizados com luz ultravioleta; suspensos em PBS com pH 7,2 estéril nas concentrações de 1mg/ml; homogeneizados por ultra-som durante 30 segundos e por vortex imediatamente antes da inoculação no camundongo. Concentrações diferentes de nanotubos de carbono foram testadas e a concentração ótima foi estabelecida em 10 μg /camundongo e administrada por via intravenosa.

3.4 Imunização com Ovalbumina (OVA)

Camundongos C57Bl/6 foram sensibilizados através de injeção subcutânea de 0,1ml de uma emulsão composta por OVA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), tampão salino fosfato (PBS) e Adjuvante Completo de Freund (CFA). Os animais foram separados

em três grupos e imunizados com OVA (100µg/animal) e NT1 (10µg/ml); OVA (100µg/animal) e NT5 (10µg/ml) ou somente OVA. No sétimo dia após a imunização, foi dado um reforço, com as mesmas quantidades de OVA, PBS, e nesta fase, o CFA foi substituído pelo Adjuvante Incompleto de Freund. O sacrifício desses animais foi realizado uma semana após o reforço e o soro do sangue foi utilizado na quantificação de anticorpos anti-ova.

3.5 Quantificação de diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo

Os linfócitos T CD4 e CD8 foram determinados pela citometria de fluxo das células esplênicas utilizando-se anticorpos monoclonais. Brevemente, as células tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células por ml, em tubos de *ependorf*. Adicionou-se então o anticorpo monoclonal específico (anti-CD4 e anti-CD8) conjugado com PE ou FITC. As células marcadas, assim como os isotipos controles, foram então lavadas e fixadas com paraformaldeído (2%) e a leitura feita em citômetro de fluxo Scalibur da BD Biosystems no Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro da UNICAMP.

3.6 Resposta Linfoproliferativa

Os baços foram removidos assepticamente 24 horas, 7 dias e 15 dias após a administração retro-orbital dos nanotubos de carbono e colocados em placas de Petri contendo meio RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Foram, então, dispersos mecanicamente através de uma peneira de *nylon* para obtenção de suspensões simples de células. Após a primeira centrifugação, tratou-se o botão celular das células esplênicas com solução de cloreto de amônio a 0,82% para lise das hemácias. As células em suspensão foram lavadas por duas vezes com solução balanceada de Hanks e ressuspendidas em meio RPMI 1640 enriquecido com Soro Fetal Bovino a 5%, 4,25mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina a 0,2M e 2-mercaptoetanol a 1:5000. Para a determinação da viabilidade celular, usou-se o método de exclusão com Azul de Trypan.

A suspensão celular obtida do baço foi ajustada para a concentração de 2×10^5 células/poço e colocada em microplacas para cultura de células de 96 cavidades para estimulação com $2,5 \mu\text{g/ml}$ de Concanavalina-A (ConA) por 72 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As células foram incubadas em estufa com sistema de CO_2 a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37°C . Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, cada poço recebeu $1,0 \mu\text{Ci}$ de Timidina tritiada (^3H). Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado lavando-se as células em um coletor (Cell harvester – modelo 200 A – Cambridge Technology Inc., USA). Em seguida, as células foram recuperadas em papel filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology Inc., USA) e colocadas em tubos padronizados na presença de 2 ml de líquido de cintilação (3g/l de PPO em toluol). A incorporação de Timidina ^3H foi determinada em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 Series Scintillation System). Os resultados são expressos em contagens por minuto (CPM), sendo consideradas as médias das triplicatas.

3.7 Expressão de mRNA das citocinas por RT-PCR quantitativo

A expressão dos genes para citocinas foi avaliada por *real time* PCR (reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa quantitativa). Brevemente, o RNA total foi extraído das células esplênicas utilizando-se Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Procedeu-se então à conversão desse mRNA em cDNA total. Análise Taqman foi realizada usando o ABI Prism 7500 Sequence Detector Taqman (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) localizado no CEBMEG da UNICAMP. Os *primers* β -actina, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10 e $\text{TGF}\beta_1$ foram obtidos da Applied Biosystems. A expressão dos genes foi avaliada e comparada com a expressão relativa de um gene de expressão constitutiva (β -actina). Os dados foram obtidos por medidas em duplicatas independentes. O valor limiar cíclico de cada medida não excedeu 0,5 ciclo de amplificação.

3.8 Quantificação de anticorpos anti-OVA

As microplacas para ensaios enzimáticos (NUNC - Denmark) foram incubadas com 25µg/ml de OVA em 0,1M NaHCO₃ (pH=8,5) por 20 horas a 4°C. Em seguida, as reações inespecíficas foram bloqueadas com 10% de soro fetal bovino - SFB/PBS por 2 horas em temperatura ambiente e, então, adicionou-se o soro e incubou-se por 20 horas a 4°C. Então, 2,0µg/ml de anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chem. MO, USA) foram adicionados, seguidos pelo substrato de peroxidase (10mg de OPD em 10ml de ácido cítrico pH 5,5 e 10µl de H₂O₂). A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm. Para evitar a variação nos resultados, todas as amostras de soro foram testadas ao mesmo tempo.

3.9 Análises estatísticas

A significância estatística dos resultados foi determinada pela análise de variância não-paramétrica Kruskal-Wallis. Um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização Raman e morfológica FESEM dos nanotubos de carbono

A Figura 1 apresenta os espectros típicos de Raman das amostras assim que depositadas (NT1 e NT4) e da amostra comercial NT5. Os espectros podem ser divididos em regiões de frequência de primeira e segunda ordem. Na região de primeira ordem aparecem dois picos intensos em 1344 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} , correspondentes ao pico de desordem sp^2 (linha D) e ao pico de grafite altamente orientada $\text{E}_{2g}\text{ sp}^2$ (linha G). Na região de segunda ordem, há um pico intenso em 2687 cm^{-1} que corresponde ao segundo harmônico da linha D ($2 \times \text{D}$), um pequeno pico em torno de 2921 cm^{-1} , que corresponde à soma das frequências das linhas D e G ($\text{D} + \text{G}$), e um pequeno pico em torno de 3202 cm^{-1} , que corresponde ao segundo harmônico da linha G ($2 \times \text{G}$). Em todas as amostras, a intensidade do pico D é maior quando comparada à intensidade do pico G correspondente, o que não indica um alto grau de ordem C-C sp^2 , correspondendo aos espectros Raman de nanotubos de carbono desordenados de paredes múltiplas.

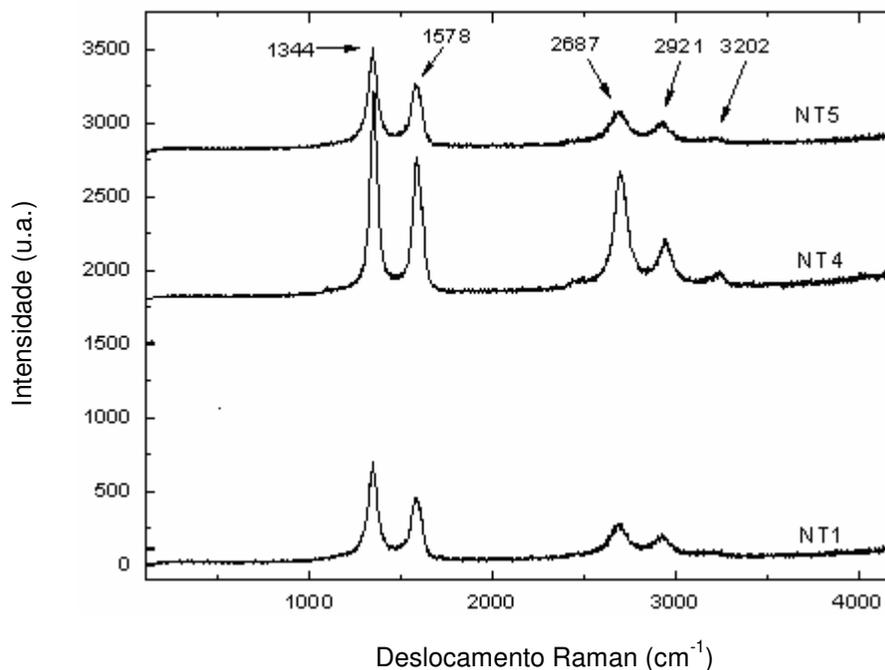
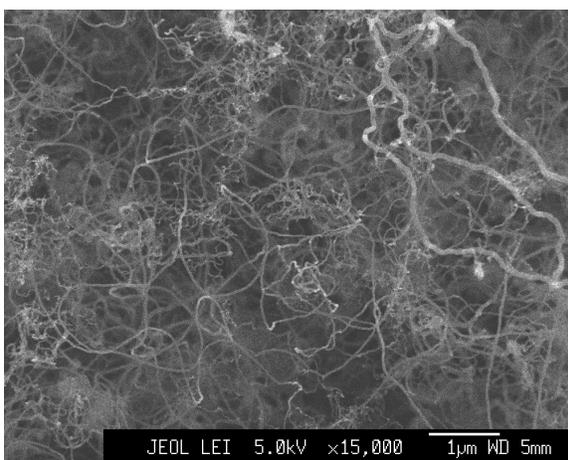
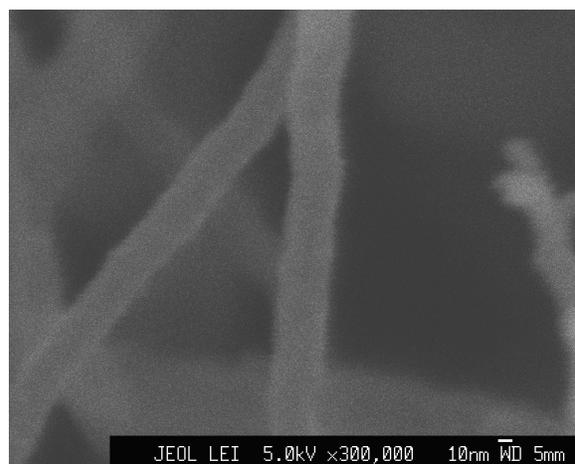


Figura 1. Espectros típicos de Raman das amostras NT1 e NT4 assim que depositadas, e da amostra comercial NT5.

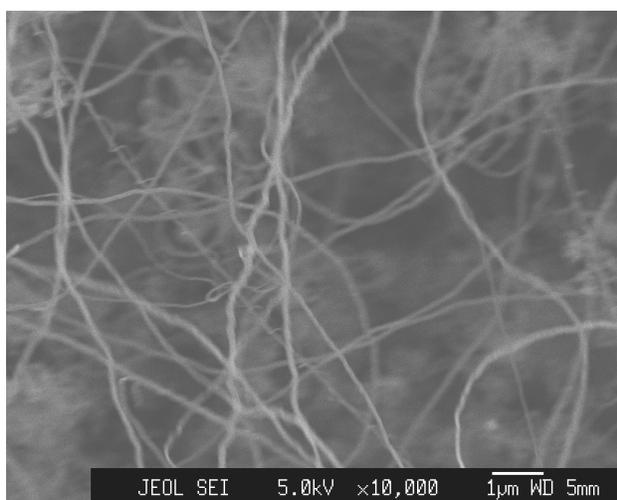
A Figura 2 (a) - (d) apresenta imagens típicas de FESEM das amostras assim que depositadas (NT1 e NT4) em diferentes ampliações. As barras da escala são de $1\mu\text{m}$ a 10nm . As amostras NT1 e NT4 correspondem às imagens (a, b) e (c, d) respectivamente. As imagens ilustram claramente que as amostras assim que depositadas consistem de estruturas tubulares não-alinhadas com aglomerações emaranhadas que cobrem a superfície do substrato (veja as imagens a e c). Com maior aumento (veja imagem b) pode-se verificar que a amostra NT1 apresenta tubos com diâmetro externo de aproximadamente 30nm (imagem b). Finalmente, para as amostras de NT4, produzidas a partir de dimetil benzeno, a densidade de tubos é menor (veja imagem c), mas os tubos são longos, com superfícies lisas (imagem d) e diâmetro externo de cerca de 100nm .



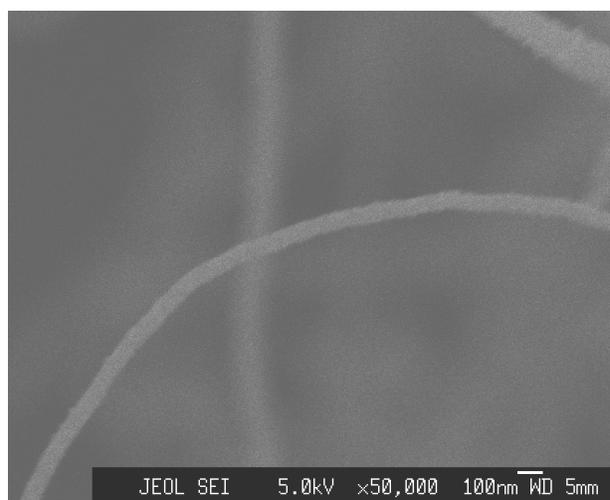
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2 (a,b,c,d). Imagens típicas de FESEM das amostras assim que depositadas em diferentes ampliações. (a-b) NT1 e (c-d) NT4.

4.2 Resposta dos linfócitos T após a administração *in vivo* dos nanotubos de carbono por citometria de fluxo

A fim de verificar o efeito da administração sistêmica de nanotubos de carbono nas populações de linfócitos T, os linfócitos T CD4 e CD8 foram determinados pela citometria de fluxo das células esplênicas. O baço foi analisado porque é o responsável por filtrar o sangue contendo as nanopartículas. Os nanotubos de carbono foram administrados por 24 horas, 7 dias e 15 dias e o número de linfócitos T CD4 e CD8 foi quantificado. Nenhuma mudança significativa na relação CD4/CD8 foi observada quando todas as preparações foram estudadas (Figura 3).

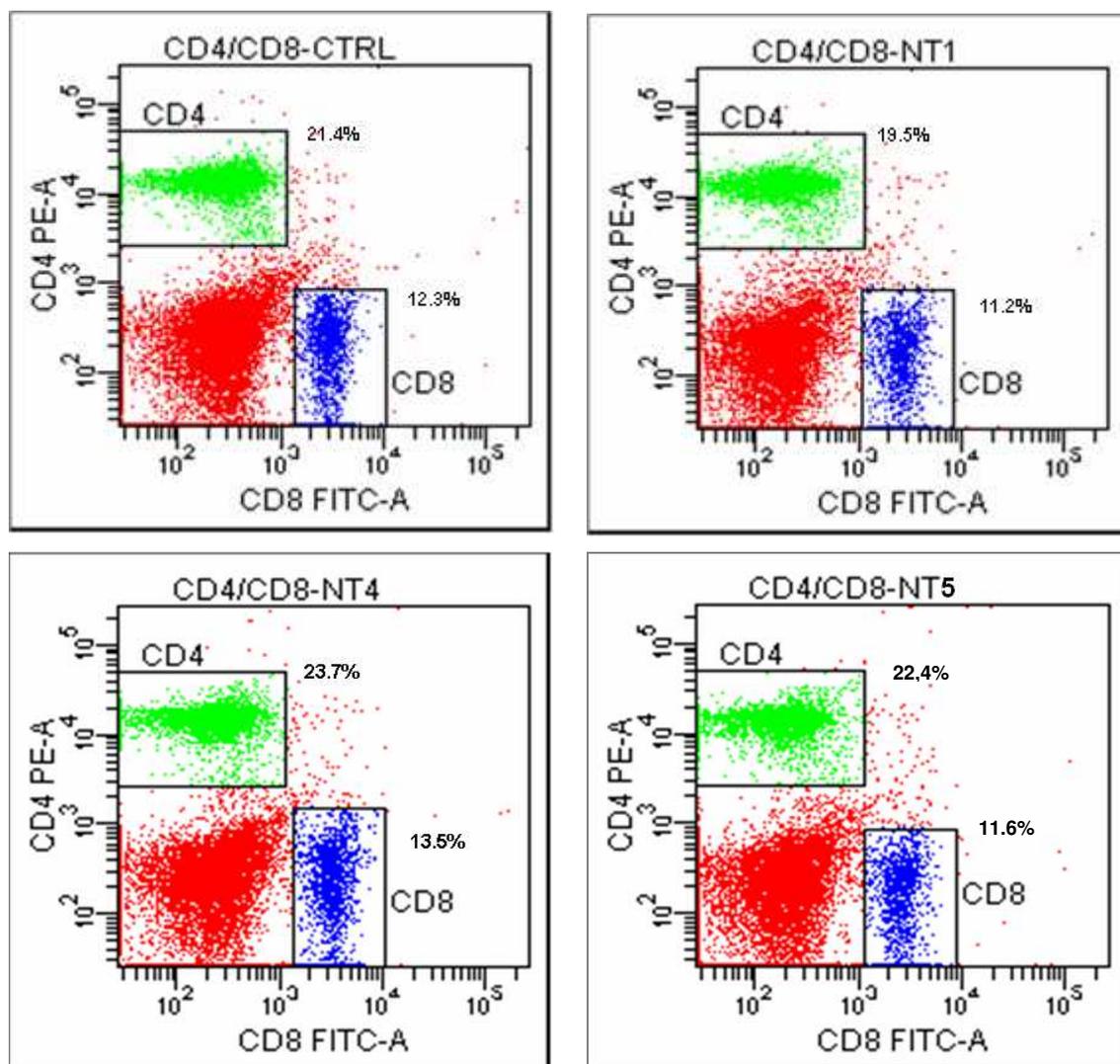


Figura 3. Relação de linfócitos T CD4/CD8 após a administração *in vivo* dos nanotubos de carbono.

4.3 Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA após a administração *in vivo* de nanotubos de carbono

Como os marcadores expressos na superfície dos linfócitos (CD4/CD8) não refletem necessariamente suas funções, investigou-se se a administração de nanotubos de carbono modifica a resposta imune celular dos camundongos C57Bl/6. Assim, a resposta proliferativa dos linfócitos estimulados com o mitógeno inespecífico ConA, um método clássico para avaliar a função dos linfócitos, foi determinada nas células esplênicas (Figura 4). Os resultados demonstram que o nanotubo NT1 e de forma mais discreta o NT5 estimularam significativamente a resposta proliferativa dos linfócitos. A estimulação das células T limitou-se apenas as primeiras 24 horas após a administração dos nanotubos. Nenhuma modificação significativa na proliferação de células T foi observada 7 dias e 15 dias após a administração dos nanotubos NT1 e NT5, enquanto uma redução significativa na proliferação dos linfócitos foi observada após a inoculação do nanotubo NT4, sugerindo o efeito tóxico desta preparação.

No presente estudo, os nanotubos NT1 e NT4 foram catalisados com níquel, entretanto, nenhuma toxicidade foi observada quando o nanotubo NT1 foi administrado numa concentração muito baixa (10µg/camundongo). Em contraste, na mesma concentração, a preparação contendo xilol (NT4) foi extremamente tóxica e inadequada para o uso *in vivo*.

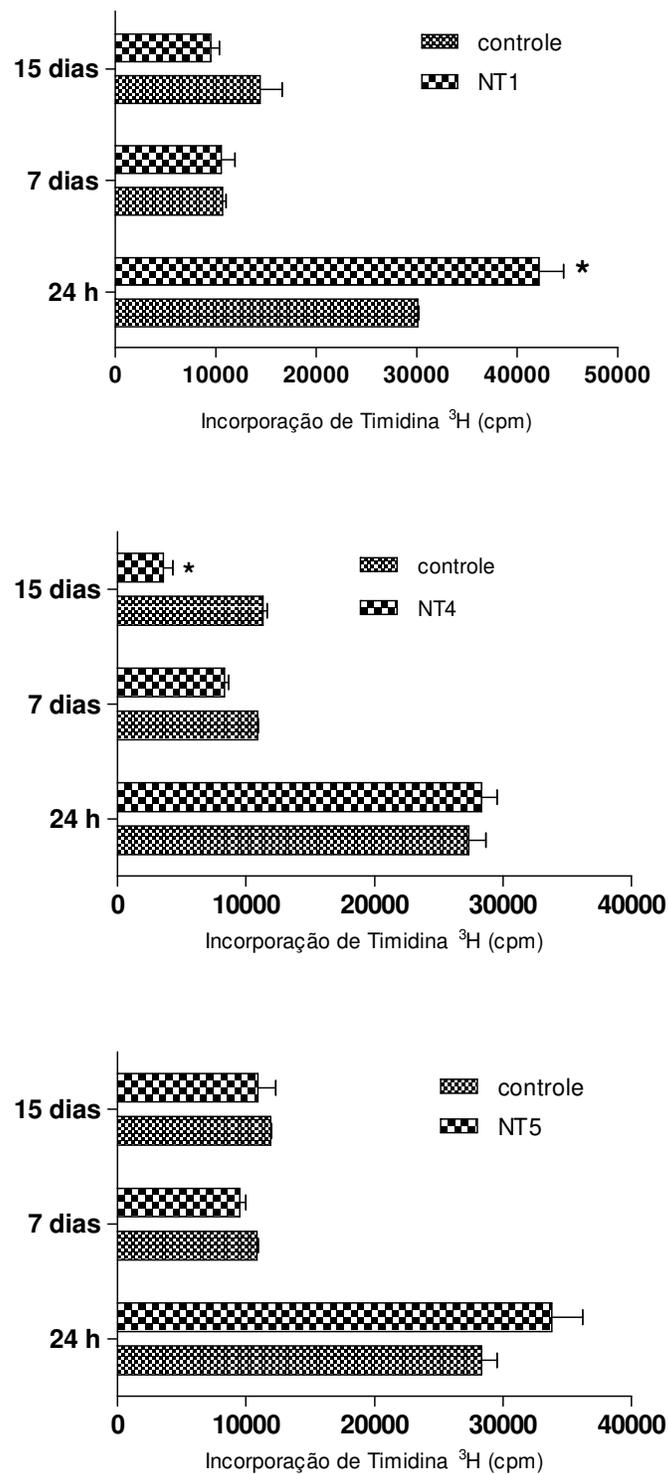


Figura 4. Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA após a administração *in vivo* de nanotubos de carbono. A resposta proliferativa foi avaliada pela incorporação de timidina H^3 .

4.4 Expressão gênica do mRNA das citocinas pelos linfócitos dos camundongos C57Bl/6 após a administração *in vivo* de nanotubos de carbono

A função dos linfócitos pode ser avaliada tanto pela característica proliferativa como pelo produto destas células. Visto que o nanotubo NT1 estimulou a resposta proliferativa do linfócito T, seu efeito na expressão do mRNA das citocinas também foi estudado pela reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) usando o *TaqMan real-time PCR*.

Todos os experimentos envolveram pelo menos 3 camundongos por grupo e o mRNA de cada camundongo foi avaliado. Os resultados apresentados na figura 5 demonstram que a administração *in vivo* do nanotubo NT1 induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) na expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α e IL-6, as quais são produzidas principalmente pelos macrófagos. A expressão do mRNA destas citocinas está aumentada nas primeiras 24 horas após a administração do nanotubo NT1 e está diminuída nas duas semanas seguintes. Por outro lado, o IFN γ , que é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente pelos linfócitos, tem um aumento significativo na expressão 7 dias e 15 dias após a inoculação do nanotubo NT1. Os resultados sugerem que as citocinas produzidas pelos macrófagos na fase inicial da resposta imune (primeiras 24 horas) influenciam a produção subsequente de citocinas pelos linfócitos T na resposta imune adaptativa.

As citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF β também foram estudadas. Demonstrou-se um aumento significativo na produção de IL-10, que é produzida pelos linfócitos T Th2, bem como pelos linfócitos B, nas primeiras 24 horas após a inoculação do nanotubo de carbono. Apesar da função antiinflamatória da IL-10 ser bem estabelecida, o reparo do tecido durante a resposta inflamatória também é descrito para esta citocina. Embora o nível de TGF β esteja diminuído, esta citocina é bem conhecida como uma importante citocina antiinflamatória e também está envolvida na imunossupressão (*downregulation*) das citocinas pró-inflamatórias, com o objetivo de manter a homeostase na resposta inflamatória. Ainda na figura 5, observa-se que embora a expressão do mRNA

desta citocina esteja diminuída em relação ao controle, ela está moderadamente aumentada na última fase da resposta inflamatória.

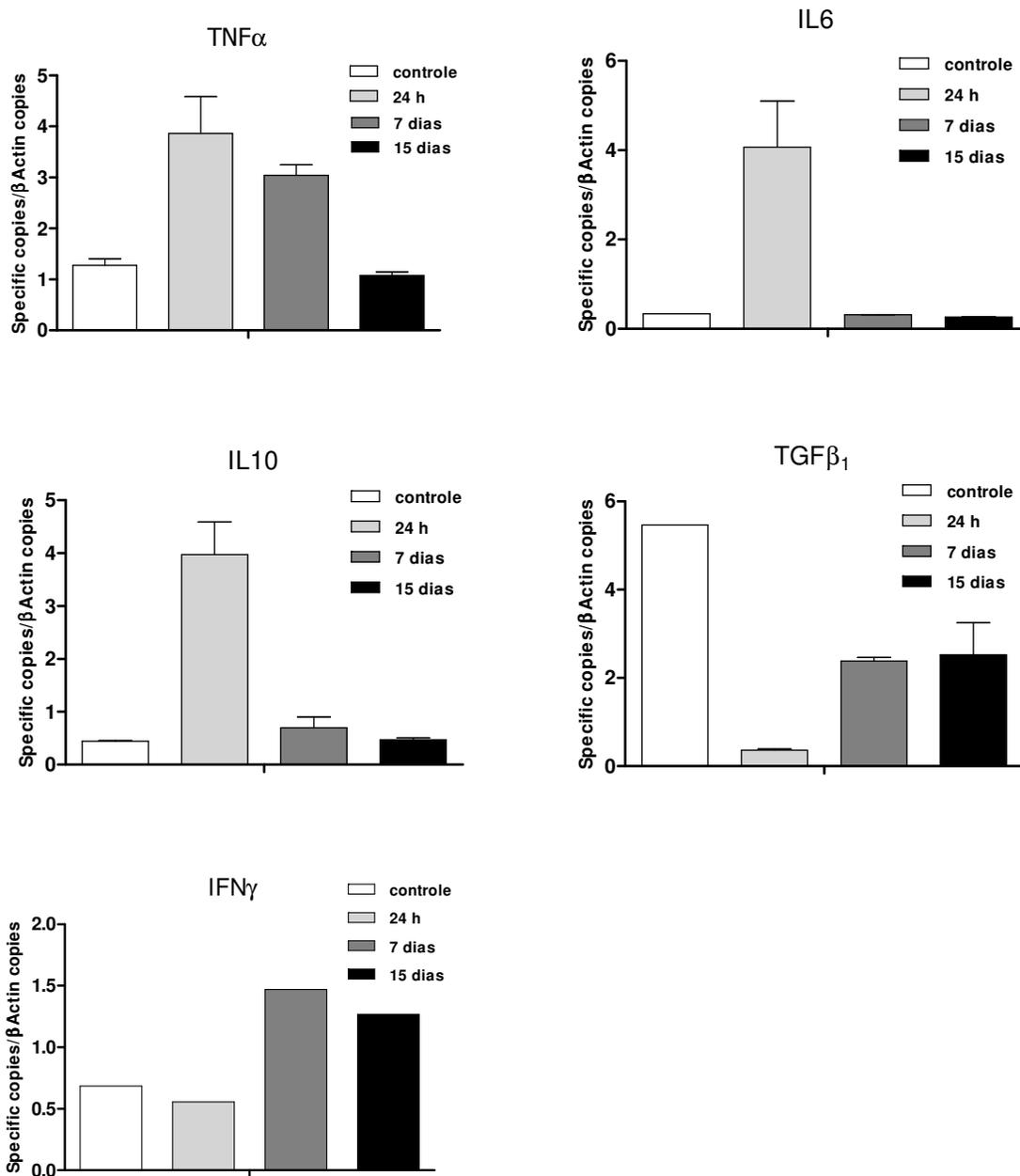


Figura 5. Expressão gênica do mRNA de citocinas pelas células do baço após a administração sistêmica do nanotubo NT1. A expressão das citocinas foi avaliada 24 horas, 7 dias e 15 dias após a administração *in vivo* do NT1.

4.5 Resposta de anticorpos a OVA após a administração *in vivo* de nanotubos de carbono

A produção de anticorpo para um antígeno específico é o resultado de uma cooperação complexa entre linfócitos T CD4 e linfócitos B. Esta colaboração é mediada por citocinas, tais como $\text{IFN}\gamma$, IL-10 e $\text{TGF}\beta$. A fim de investigar se as citocinas produzidas pelos linfócitos T estimulados pelos nanotubos NT1 e NT5 modificam a resposta ao anticorpo, quantificou-se a produção de anticorpos em resposta a OVA após a administração *in vivo* de nanotubos de carbono. A figura 6 demonstra claramente um aumento significativo nos níveis de anticorpos anti-OVA produzidos pelo camundongo imunizado com OVA e os nanotubos. Estes resultados sugerem o importante efeito adjuvante dos nanotubos de carbono.

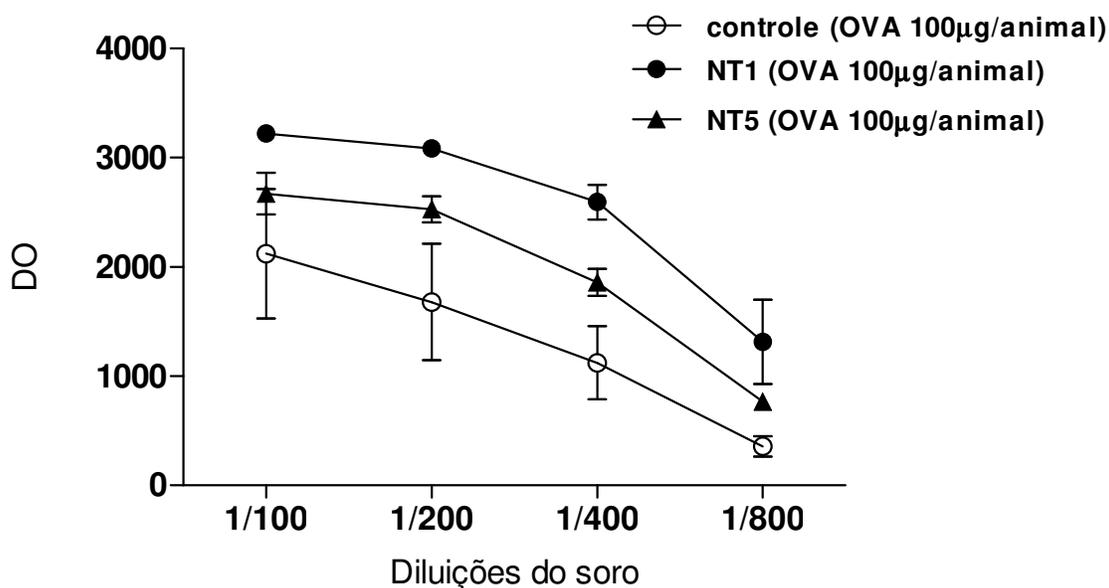


Figura 6. Produção de anticorpos (IgG) anti-OVA por camundongos C57Bl/6 inoculados ou não com nanotubos de carbono.

5. DISCUSSÃO

Diferentes nanotubos de carbono foram testados *in vivo* na resposta de linfócitos T e B. Dois nanotubos foram crescidos em nossos laboratórios e seus efeitos na resposta imune foram comparados com um nanotubo vendido comercialmente.

No presente estudo, mostramos que os nanotubos de carbono NT4 foram extremamente tóxicos, causando esplenomegalia e, algumas vezes, a morte do animal, tornando-se completamente inadequados para o uso *in vivo*. A fonte de átomos de carbono utilizada na preparação do NT4 foi dimetil benzeno (xilol) e seu vapor pode ser a fonte de contaminação dos nanotubos NT4, uma vez que o xilol tem seus efeitos citotóxicos bem estabelecidos [68]. A toxicidade intrínseca do NT não depende apenas do grau de funcionalização da superfície e da toxicidade diferente dos grupos funcionais.

Quantidades de NTs puros (não purificados e/ou não-funcionalizados) imediatamente após a síntese contêm impurezas, como carbono amorfo e nanopartículas metálicas (catalisadores como Co, Fe, Ni e Mo), que também podem ser fonte de efeitos tóxicos severos e isso é relatado em estudos mesmo utilizando-se NT puro [18].

Os nanotubos NT1 não apresentaram qualquer tipo de toxicidade quando inoculados nos animais, embora na produção dos mesmos tenha sido usado o Ni como catalisador. Isto é relevante, já que a não interferência na resposta imune é esperada para uma nanopartícula ideal, considerando o uso destas estruturas com o propósito de entregadoras de fármacos. Diferentes concentrações foram testadas e o efeito biológico e não tóxico foi estabelecido em 10µg por camundongo. Esses resultados estão em acordo com um trabalho recentemente publicado que mostrou que a exposição por inalação de MWNTs, em baixas concentrações, não resultou em danos significativos ao tecido pulmonar [69].

Inúmeros estudos *in vitro* investigaram as interações entre NTs e várias células de mamíferos. Estas interações induziram carências nutricionais [70], efeitos antiproliferativos [71-72], diminuição da adesão celular [71], apoptose [71;73], necrose [73], e estresse oxidativo [74]. No entanto, o efeito *in vivo* dos nanotubos de carbono não está bem entendido, principalmente na resposta imune adaptativa.

A resposta imune adaptativa é resultado direto da resposta imune inata. A ativação dos macrófagos e células *natural killer* durante a resposta imune inata vai influenciar a resposta dos linfócitos e conseqüentemente a produção de anticorpos. A formação de granulomas no tecido pulmonar após a inalação de nanotubos de carbono está bem descrita na literatura [75-77]; e é uma resposta de hipersensibilidade de tipo tardia em que os linfócitos T CD4 e macrófagos estão envolvidos [78]. Um trabalho relativamente recente mostra que a administração subcutânea de nanotubos de carbono leva a formação de granulomas e aumento dos linfócitos T CD4 circulantes [79]. No presente estudo, nanotubos de carbono foram administrados sistemicamente e as populações de linfócitos T CD4 e CD8 foram quantificadas. Nossos resultados mostram que não houve modificação significativa das percentagens das duas populações de linfócitos após a administração das preparações de nanotubos de carbono (NT1 e NT5). No entanto, o fato de o número de linfócitos T permanecer normal após o tratamento, não significa necessariamente que a função dessas células não tenha sido alterada. Assim, estudamos o efeito dos nanotubos de carbono na resposta proliferativa e na expressão de mRNA das citocinas.

A resposta proliferativa de linfócitos quando estimulados com a ConA é um método clássico de avaliação da imunidade celular. Os linfócitos íntegros normalmente respondem ao estímulo com essa lectina [80]. Nesse estudo, fomos capazes de mostrar que tanto os nanotubos produzidos em nosso laboratório, como o obtido comercialmente, induziram um significativo aumento da resposta proliferativa dos linfócitos 24 h após a administração sistêmica. Essa ativação linfocitária pode ser explicada pela ativação dos macrófagos durante a resposta inata. A fagocitose dos nanotubos resultou na ativação de macrófagos peritoneais. Essa ativação foi mensurada pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IFN γ . A literatura mostra que partículas inertes como a sílica podem ativar inespecificamente os linfócitos por atuarem como super-antígenos [81]. No entanto, nos nossos experimentos não observamos aumento de proliferação significativa na ausência do mitógeno, sugerindo o efeito de citocinas pró-inflamatórias.

Paralelamente à ativação dos linfócitos, fomos capazes de demonstrar que a administração dos nanotubos de carbono induziu aumento significativo na expressão do

mRNA de TNF α , IL-6, IFN γ e IL-10 e uma redução significativa da citocina imunossupressora TGF β . A expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-6) predominou nas primeiras 24 horas após a administração dos nanotubos. Estes resultados sugerem que a administração sistêmica dos nanotubos de carbono alcançou o baço e induziu a produção destas citocinas pelos macrófagos. A produção de TNF α é relevante, já que o TNF exerce diversas ações biológicas e é identificado como um mediador sistêmico de uma resposta bem sucedida contra infecção bacteriana e é um componente da inflamação. A produção de IL-6 também deve ser notada, já que esta citocina pode ser caracterizada pelas influências multidirecionais e é considerada como um dos principais fatores que regulam os mecanismos de defesa. Sua principal função é participar na resposta imunológica nas reações inflamatórias, uma vez que é o principal estímulo para a geração de proteínas da fase aguda pelo fígado [82].

Com a progressão da ativação imune, os linfócitos T iniciam a produção de IFN γ , que é predominante 7 dias após a inoculação dos nanotubos. O IFN γ é reconhecido como a citocina mais importante na conversão dos macrófagos de um estado de repouso para um estado ativado, prolongando a ativação da resposta imune [83]. É notável, também, que o tratamento com NT1 reduziu significativamente a expressão gênica do TGF β , uma citocina antiinflamatória, enquanto os níveis de IL-10 estavam aumentados. A IL-10 é uma citocina funcional dicotômica, tem características de uma citocina imunossupressora e imunoestimulatória [84]. A IL-10 liberada das células hospedeiras frequentemente protege o hospedeiro da hiperinflamação, capaz de danificar os tecidos [85], assim como a IL-10 endógena muitas vezes impõe uma função supressora nas células T CD4+ [86-88]. Além disso, a IL-10 é um potente co-fator para a célula B sobreviver, proliferar, diferenciar e secretar imunoglobulinas [89-90].

O efeito das citocinas presentes no microambiente sobre a produção dos anticorpos é uma observação clássica na imunologia. Citocinas como o IFN γ polarizam a produção da imunoglobulina IgG2a [57]; a IL-4 está envolvida na síntese de IgG1 [57] e o TGF β é um dos responsáveis pela síntese de IgA nas mucosas intestinais [56]. Dessa forma, o próximo passo foi avaliar a produção de anticorpos contra OVA nos animais tratados com os

nanotubos de carbono. Os resultados deste trabalho mostraram claramente que a presença de NT1 e NT5 na emulsão CFA e OVA estimularam significativamente a produção de anticorpos para OVA.

Até onde temos conhecimento esse é um dos primeiros trabalhos a associar a administração sistêmica de nanotubos de carbono com o aumento de anticorpos específicos para determinado antígeno. A resposta imunológica é o resultado de complexas interações e esse sistema é mantido por um delicado equilíbrio. Alterações nas interações imunológicas tanto podem ser benéficas como podem ser prejudiciais ao organismo.

O aumento dos anticorpos causados por partículas inertes como a sílica já foi descrito em trabalhos anteriores. Ratos estimulados com ovalbumina associada à sílica tiveram a produção de anticorpos de subclasse IgG1 e da classe IgE aumentada [91]. Em humanos, a silicose e pneumoconiose causadas por poeiras minerais também têm sido associadas a alterações da imunidade humoral que incluem o aumento dos níveis de auto-anticorpos, complexos imunes, e excesso de produção de imunoglobulinas (principalmente IgG) [92], e alta prevalência de esclerodermia, artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico [65].

Os dados apresentados mostram que os nanotubos de carbono têm atividade pró-inflamatória e podem ativar tanto a resposta imune celular como a resposta imune humoral. Assim, em situações nas quais o indivíduo apresenta deficiência da imunidade celular ou humoral, a administração dos nanotubos de carbono pode ser benéfica. Trabalhos clássicos da imunologia de tumores mostram que indivíduos portadores de neoplasias apresentam deficiência da imunidade celular [93-94]. A abordagem imunoterapêutica mais usada nesses casos é a ativação da resposta inflamatória, tanto através da administração das citocinas, como na manipulação das células dendríticas, sempre no sentido de aumentar a resposta imune contra as células tumorais. O fato de os nanotubos estimularem a produção de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ que sabidamente têm efeito antitumoral [95-96] reforça a possível aplicação dos nanotubos de carbono no tratamento de indivíduos portadores de tumor.

Embora a administração de baixa dose de nanotubos de carbono não tenha resultado em reações citotóxicas detectáveis, estudos adicionais serão necessários para estabelecer a segurança biológica no uso dessas partículas. Esse estudo enfatiza a importância de se avaliar o efeito dos nanotubos de carbono não funcionalizados na resposta imune de um indivíduo antes de aplicá-los em protocolos terapêuticos. A relevância desse estudo é apresentar evidências de que os nanotubos de carbono estimulam a resposta imune celular e humoral, propriedades que podem ser utilizadas em sinergismo com outras abordagens terapêuticas, em situações patológicas onde se observa deficiência imunológica como é o caso das neoplasias.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Nenhuma mudança significativa na relação dos linfócitos T CD4/CD8 foi observada após a administração *in vivo* dos nanotubos de carbono.
- ❖ A administração *in vivo* dos nanotubos de carbono (NT1 e NT5) levou a um aumento significativo da resposta proliferativa de linfócitos estimulados com ConA.
- ❖ Nenhuma toxicidade foi observada após a administração *in vivo* do nanotubo NT1. Em contraste, o nanotubo NT4 foi extremamente tóxico e inadequado para o uso *in vivo*.
- ❖ Demonstrou-se claramente o aumento na expressão do mRNA de TNF α , IL-6, IFN γ e IL-10 e uma redução significativa da citocina imunossupressora TGF β .
- ❖ As imunizações com OVA e NT1; e OVA e NT5 aumentaram significativamente os níveis de anticorpos anti-OVA produzidos pelo camundongo, sugerindo o importante efeito adjuvante dos nanotubos de carbono.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7. Sugestões para Trabalhos Futuros

- ❖ Estabelecer a segurança biológica no uso de nanopartículas de carbono.
- ❖ Funcionalização dos nanotubos de carbono.
- ❖ Avaliação do efeito dos nanotubos de carbono funcionalizados na resposta imune.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Martin CR and Kohli P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nature Reviews Drug Discovery* (2):29-37, 2003.
- [2] Warheit DB, Sayes CM, Reed KL and Swain KA. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & Therapeutics* (120):35-42, 2008.
- [3] Sanvicens N and Marco MP. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* (26): 425-433, 2008.
- [4] Liu H and Webster TJ. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* (28):354-369, 2007.
- [5] Hurt RH, Monthieux M and Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon* (44):1028-1033, 2006.
- [6] Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (1):2-9, 2005.
- [7] Caruthers SD, Wickline AS and Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion in Biotechnology* (18):26-30, 2007.
- [8] Craighead H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* (442):387-393, 2006.
- [9] Pettigrew RI, Fee CA and Li KC. Changes in the world of biomedical research are moving the field of ‘personalized medicine’ from concept to reality. *J Nucl Med* (45):1427, 2004.

- [10] Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* (83):761-769, 2008.
- [11] Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD and Prato M. Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chem Commun* (5): 571-577, 2005.
- [12] Dresselhaus M, Dresselhaus G, Eklund P and Saito R. Carbon nanotubes. *Phys World* 33-38, 1998.
- [13] Koerner H, Price G, Pearce NA, Alexander M and Vaia RA. Remotely actuated polymer nanocomposites – stress-recovery of carbon nanotube filled thermoplastic elastomers. *Nature Mater* (3):115-120, 2004.
- [14] Sen R, Zhao B, Perea D, Itkis ME, Hu H and Love J. Preparation of single-walled carbon nanotube reinforced polystyrene and polyurethane nano-fibers and membranes by electrospinning. *Nano Lett* (4):459-464, 2004.
- [15] Grunlun JC, Mehrabi AR, Bannon MV and Bahr JL. Water-based single-walled-nanotube-filled polymer composite with an exceptionally low percolation threshold. *Adv Mater* (16):150-153, 2004.
- [16] Huang J, Li X, Xu J and Li H. Well-dispersed single-walled carbon nanotube/polyaniline composite films. *Carbon* (41): 2731-2736, 2003.
- [17] Supronowicz PR, Ajayan PM, Ullman KR, Arulanandam BP, Metzger DW and Bizios R. Novel-current conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *J Biomed Mater Res* (59A):499-506, 2002.

- [18] Lacerda L, Bianco A, Prato M and Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews* (58):1460-1470, 2006.
- [19] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* (354):56-58, 1991.
- [20] Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* (363):603-605, 1993.
- [21] Bethune DS, Kiang CH, de Vries MS, Gorman G, Savoy R, Vazquez J and Beyers R. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* (363):605-607, 1993.
- [22] Smalley RE, Thess A, Lee R, Nikolaev P, Dai H, Petit P, Robert J, Xu C, Lee YH, Kim SG, Rinzler AG, Colbert DT, Scuseria GE, Tomanek D and Fischer JE. Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science* (273):483, 1996.
- [23] Yacaman MJ, Yoshida MM, Rendon L and Santiesteban JG. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Appl Phys Lett* (62):202-204, 1993.
- [24] Cassell AM, Raymakers JA, Kong J, and Dai H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B* (103):6484-6492, 1999.
- [25] Zhang ZJ, Wei BQ, Ramanath G and Ajayan PM. Substrate-site selective growth of aligned carbon nanotubes. *Appl Phys Lett* (77):3764-3766, 2000.
- [26] Dai H. Controlling Nanotube Growth. *Physics World* (13):43-47, 2000.
- [27] Foldvari M and Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (4):173-182, 2008.

- [28] Popov VN. Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering R* (43):61-102, 2004.
- [29] Droppa Jr R, Ribeiro CTM, Zanatta AR, dos Santos MC and Alvarez F. Comprehensive spectroscopic study of nitrogenated carbon nanotubes. *Physical Review B* (69):045405, 2004.
- [30] Kam NWS, Liu Z and Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew Chem Int Ed Engl.* (45):577-581, 2006.
- [31] Pantarotto D, Briand J-P, Prato M and Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun* (1):16-17, 2004.
- [32] Deng X, Jia G, Wang H, Sun H, Wang X, Yang S, Wang T and Liu Y. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon* (45):1419-1424, 2007.
- [33] Reilly RM. Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. *The Journal of Nuclear Medicine* (48):1039-1042, 2007.
- [34] Zhou H, Mu Q, Gao N, Liu A, Xing Y, Gao S, Zhang Q, Qu G, Chen Y, Liu G, Zhang B and Yan B. A Nano-Combinatorial Library Strategy for the Discovery of Nanotubes with Reduced Protein-Binding, Cytotoxicity, and Immune Response. *Nano Lett* (8):859-865, 2008.
- [35] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand J-P, Prato M, Muller S and Bianco A. Functionalized Carbon Nanotubes Are Non-Cytotoxic and Preserve the Functionality of Primary Immune Cells. *Nano Lett* (6):1522-1528, 2006.

- [36] Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H and Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* (10):993-998, 2004.
- [37] McAteer MA, Sibson NR, von Zur Muhlen C, Schneider JE, Lowe AS, Warrick N, Channon KM, Anthony DC and Choudhury RP. In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat Med* (13):1253-1258, 2007.
- [38] Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN and Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (99):12617-12621, 2002.
- [39] Oberdörster G, Oberdörster E and Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* (113):823-839, 2005.
- [40] Fischer HC and Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol* (18):565-571, 2007.
- [41] Nel A, Xia T, Mädler L and Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* (311):622-667, 2006.
- [42] Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, Kissel T and Seeger W. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol* (215):100-108, 2006.
- [43] Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP and Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem* (15):79-86, 2004.

- [44] Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol Sci* (98):249-257, 2007.
- [45] Smart SK, Cassady AI, Lu GQ and Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* (44):1034-1047, 2006.
- [46] Dreher KL. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological Sciences* (77):3-5, 2004.
- [47] Thomas K and Sayre P. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part I: evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials. *Toxicological Sciences* (87):316-321, 2005.
- [48] Seo JW, Magrez A, Milas M, Lee K, Lukovac V and Forró L. Catalytically grown carbon nanotubes: from synthesis to toxicity. *J Phys D: Appl Phys* (40): R109–R120, 2007.
- [49] Janeway CA Jr and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol* (21):335-376, 2002.
- [50] Mcdevitt HO. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Ann Rev Immun* (18):1-17, 2000.
- [51] Lenschow DJ, Walunas TL and Bluestone JA. CD28-B7 System of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol* (14):233-258, 1996.
- [52] Chitnis T and Khoury SJ. Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Allergy Clin Immunol* (112):837-849, 2003.

- [53] Walunas TL, Lenchow DJ, Bakker CYL, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB and Bluestone JA. CTLA4 can function as negative regulation of T cell activation. *Immunity* (1):405-413, 1994.
- [54] Gomes NA, Gattas CR, Barreto-de-Souza V, Wilson ME and Dos Reis GA. TGF- β mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J Immunol* (164): 2001-2008, 2000.
- [55] Mossmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL. Two types of murine T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* (136): 2348-2357, 1986.
- [56] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA and Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* (265):1237-1240, 1994.
- [57] Romagnani S. T cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* (85):9-18, 2000.
- [58] Druet P, Sheela R and Pelletier L. Th1 and Th2 cells in autoimmunity. *Chem Immunol* (63):158-170, 1996. Review.
- [59] Willenborg DO, Fordham SA, Bernard CC, Cowden WB and Ramshaw, IA. IFN- β plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (157):3223-3227, 1996.
- [60] Willenborg DO, Forham SA, Staykova MA, Ramshaw IA and Cowden, WB. IFN γ is critical to control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* (163):5278-5286, 1999.

- [61] Krakowski M and Owens T. Interferon- γ confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* (26):1641-1646, 1996.
- [62] Bettelli E, Oukka M and Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* (8):345-350, 2007. Review.
- [63] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* (6): 345-352, 2005.
- [64] Schwartz M and Cohen IR. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today* (21):265-268, 2000.
- [65] Parks CG, Conrad K and Cooper GS. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect* (107):793-802, 1999.
- [66] Van-Zijverden M, van-der-Pijl A, van-Pinxteren F-A, de-Haar C, Penninks A-H and van-Loveren H. Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol* (168):131-139, 2000.
- [67] Cooper GS, Miller FW and Germolec DR. Occupational exposure and autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* (2):303-313, 2002.
- [68] Veraldi A, Costantini AS, Bolejack V, Miligi L, Vineis P and van Loveren H. Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *Am J Ind Med* (49):1046-55, 2006.
- [69] Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW and McDonald JD. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci* (100): 203-214, 2007.

- [70] Nimmagadda A, Thurston K, Nollert MU and McFetridge PS. Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions. *J Biomed Mater Res Pt A* (76A):614-625, 2006.
- [71] Cui DX, Tian FR, Ozkan CS, Wang M and Gao HJ. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* (155):73-85, 2005.
- [72] Garibaldi S, Brunelli C, Bavastrello V, Ghigliotti G and Nicolini C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology* (17):391-397, 2006.
- [73] Jia G, Wang HF, Yan L, Wang X, Pei RJ, Yan T, Zhao YL and Guo XB. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* (39):1378-1383, 2005.
- [74] Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A and Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health Pt A* (66):1909-1926, 2003.
- [75] Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB and Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* (207):221-231, 2005.
- [76] Lam C-W, James JT, McCluskey R and Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* (77):126-134, 2004.
- [77] Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V and Baron P. Unusual inflammatory and

fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol* (289): L698-L708, 2005.

[78] Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* (53):241-245, 2001.

[79] Koyama S, Endo M, Kim Y-A, Hayashi T, Yanagisawa T, Osaka K, Koyama H, Haniu H and Kuroiwa N. Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon* (44):1079-1092, 2006.

[80] Niks M, Otto M, Busová B and Stefanovic J. Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *Journal of Immunological Methods* (126): 263-271, 1990.

[81] Ueki A, Yamaguchi M, Ueki H, Watanabe Y, Ohsawa G, Kinugawa K, Kawakami Y and Hyodoh F. Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. *Immunology* (82):332-335, 1994.

[82] Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K and Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* (44):1106-1111, 2006.

[83] Liu Y-J. IPC: Professional type I Interferon – Producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Ann Rev Immunol* (23):275-306, 2005.

[84] Mills KHG. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Immunol* (4):841-855, 2004. Review.

[85] Deckert M, Soltek S, Geginat G, Lütjen S, Montesinos-Rongen M, Hof H and Schlüter D. Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory

intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *Infect Immun* (69):4561-4571, 2001.

[86] Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, Greenberg PD, Stromnes IM, Iwashiro M, Sakaguchi S, Evans LH, Peterson KE, Yang G and Hasenkrug KJ. Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* (20):293-303, 2004.

[87] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J and Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* (192):1213-1222, 2000.

[88] Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U and Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* (172): 4123-4132, 2004.

[89] Ohmori H, Kanda T, Takai T and Hikida M. Induction of antigen-specific IgE response in murine lymphocytes by IL-10. *Immunol Lett* (47):127-132, 1995.

[90] Prasse A, Germann M, Pechkovsky DV, Markert A, Verres T, Stahl M, Melchers I, Luttmann W, Muller-Quernheim J and Zissel G. IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* (119):464-471, 2007.

[91] Mancino D and Bevilacqua N. Adjuvant effect of amorphous sílica on the immune response to various antigens in guinea pigs. *Int Archs Allergy Appl Immun* (53):97-103, 1977.

[92] Matsuoka Y, Tomita M, Yoshino I and Hosoda Y. Relationship between autoimmune diseases and pneumoconiosis. *Japan J Ind Health* (34):421-431, 1992.

[93] Ohm JE and Carbone DP. Immune dysfunction in cancer patients. *Oncology (Williston Park)* (16):11-18, 2002.

[94] Yang L and Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* (92):13-27, 2004.

[95] Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* (13):95-109, 2002.

[96] Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H and Okumura K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* (195):161-169, 2002.