



**CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO**  
**ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS**  
Curso de Mestrado em Nanociências

**GABRIELA DE MORAES BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE  
MÚLTIPLA CARBOXILADOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Santa Maria, RS  
Novembro, 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**GABRIELA DE MORAES BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE  
MÚLTIPLA CARBOXILADOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências, área de Ciências Tecnológicas, do Centro Universitário Franciscano – Unifra, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientador: **Prof. Dr. LUIZ CARLOS RODRIGUES JÚNIOR**  
Co-orientadora: **Profa. Dra. SOLANGE BINOTTO FAGAN**

Santa Maria, RS  
Novembro, 2010

ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

Mestrado em Nanociências

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO-ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO:

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE  
MÚLTIPLA CARBOXILADOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Elaborada por

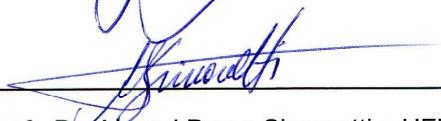
GABRIELA DE MORAES BARBOSA

COMISSÃO EXAMINADORA



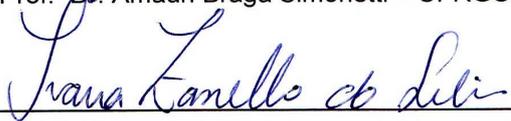
---

Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Junior - UNIFRA



---

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti – UFRGS



---

Profª. Drª. Ivana Zanella da Silva

Santa Maria, 09 de novembro de 2010.

Ficha Catalográfica

B238a

Barbosa, Gabriela de Moraes

Avaliação dos efeitos de nanotubos de carbono de parede múltipla carboxilados em células do sistema imunológico / Gabriela de Moraes Barbosa; orientação Luiz Carlos Rodrigues Júnior; co-orientação Solange Binotto Fagan. – Santa Maria, 2010.

50f. : il.

Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano.

1. Nanotubos de carbono 2. Esplenócitos 3. Adjuvante  
4. Proliferação celular 5. Linfócitos I. Rodrigues Júnior,  
Luiz Carlos II. Fagan, Solange Binotto III. Título.

CDU: 612.017:62-181.4

*Aos meus pais e ao meu irmão.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e que nunca mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos.*

*Ao meu orientador Luiz Carlos Rodrigues pela enorme paciência e dedicação com que me ajudou na realização deste trabalho*

*À minha co-orientadora, Solange Fagan por sua atenção, disponibilidade e colaboração, mas principalmente por sempre me incentivar e acreditar no desenvolvimento deste trabalho.*

*À Danieli, Jerusa, Ivi, Adrienne, Danielle, Maura, Isabel, minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado nos momentos em que precisei.*

*Ao Luis Ricardo, Gabriela, Márcia, Thaís, Camila, Rodrigo, Bruno e Carine pelo apoio, amizade e disponibilidade em me ajudar.*

*Ao Laboratório de Química do Estado Sólido da Universidade Estadual de Campinas (LQES/UNICAMP) pelo fornecimento da amostra de nanotubos de carbono.*

*Muito obrigada a todos!*

## RESUMO

Os nanotubos de carbono (NTCs) apresentam propriedades exclusivas que são de grande interesse para a área de biotecnologia. A idéia de se utilizar NTCs como carreadores de fármacos, adjuvantes para vacinas e biosensores, vem despertando muito interesse da comunidade científica. No entanto, a biocompatibilidade e toxicidade *in vitro* and *in vivo* dessas estruturas precisam ser investigadas. O objetivo desse estudo foi determinar os efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPMs) carboxilados sobre células do sistema imunológico. Para os testes *in vitro*, esplenócitos e células da medula óssea foram isolados de camundongos BALB/c fêmeas. O grupo de células tratadas foi cultivado com suspensões de NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações (1, 5 ou 10 ng/mL), enquanto o grupo controle foi cultivado apenas com meio RPMI 1640 e 10% soro fetal bovino (SFB). Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, foram analisadas viabilidade, proliferação e interação por análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos NTCPMs carboxilados com as células. No estudo *in vivo*, NTCPMs carboxilados foram administrados pela via intravenosa com concentração de 50 e 100 µg. Após 24 horas, os esplenócitos foram isolados, marcados com anticorpos anti-CD3<sup>+</sup> e anti-B220<sup>+</sup> e analisados por citometria de fluxo. A produção de IgG total foi determinada no soro de camundongos após 20 dias da administração. Os resultados encontrados indicaram que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no teste de viabilidade celular de esplenócitos, embora tenha sido observado um aumento na frequência de células diretamente proporcional às concentrações das suspensões de NTCPMs carboxilados no tempo de 48 horas. Para as células da medula, foi observada uma inversão na frequência de células nos tempos de 24 e 48 horas. Em relação à proliferação de esplenócitos, os grupos de células tratadas com NTCPMs carboxilados apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle positivo (oligonucleotídeo CpG). Nas análises feitas por MET, não foi encontrado qualquer tipo de interação dos NTCPMs carboxilados com esplenócitos tratados com NTCPMs carboxilados na concentração de 10 ng/mL. De acordo com as análises realizadas por citometria de fluxo, a porcentagem de células de CD3<sup>+</sup> e células B220<sup>+</sup> não apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle. No teste de Enzima Imunoensaio (ELISA), a produção de anticorpos IgG totais não aumentou no soro de camundongos tratados com NTCPMs carboxilados quando comparada a do grupo controle. Sendo assim, os resultados *in vitro* e *in vivo* indicam que NTCPMs carboxilados não apresentam efeitos estimulatórios sobre células do sistema imunológico e, nas mesmas condições, não apresentam toxicidade celular.

**Palavras-chave:** Nanotubos de carbono, esplenócitos, adjuvante, proliferação celular, linfócitos.

## ABSTRACT

The carbon nanotubes (CNTs) display exclusive properties which are of great interest to biotechnology area. The idea of utilizing CNTs as drug carriers, adjuvant for vaccines and biosensors is attracting much interest from scientific community. However, biocompatibility and toxicity *in vitro* and *in vivo* of these structures need to be investigated. The aim of this study was to determine the effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on cells of the immune system. For *in vitro* test, splenocytes and bone marrow cells were isolated from BALB/c female mice. The group of treated cells was cultured with carboxylic MWCNTs suspensions at different concentrations (1, 5 or 10 ng/mL), while the control group was only cultured with medium RPMI 1640 and 10% fetal calf serum (FCS). After 24, 48 and 72 hours of cultivation, the viability proliferation and interaction were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) analysis of carboxylic MWCNTs with cells. *In vivo* study, carboxylic MWCNTs were administered intravenously with a concentration of 50 and 100 µg. After 24 hours, splenocytes were isolated, labeled with anti-CD3<sup>+</sup> and anti-B220<sup>+</sup> antibodies and analyzed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Total IgG production was determined in mice serum after 20 days of administration. The results showed no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the cell viability test of splenocytes, although it has been observed an increase in the frequency of cells directly proportional to the concentrations of carboxylic MWCNTs suspensions in the period of 48 hours. For marrow cells it was observed an inversion in the frequency of cells in the periods of 24 and 48 hours. Regarding the proliferation of splenocytes, groups of cells treated with carboxylic MWCNTs showed significant difference ( $p < 0.05$ ) when compared to control positive group (CpG oligonucleotide). In the analyses performed by TEM, it was not found any type of interaction of carboxylic MWCNTs with splenocytes treated with carboxylic MWCNTs in the concentration of 10 ng/mL. According to the analyses carried out by flow cytometry, the percentage of CD3<sup>+</sup> cells and B220<sup>+</sup> cells showed no significant difference in relation to the control group. In Enzyme Immunoassay (ELISA), the total IgG antibody production did not increase in the serum of mice treated with carboxylic MWCNTs when compared to control. Thus, the results *in vitro* and *in vivo* indicate that carboxylic MWCNTs did not present stimulatory effects on cells of the immune system and, at the same conditions, no cellular toxicity.

**Keywords:** carbon nanotubes, splenocytes, adjuvants, cell proliferation, lymphocytes.

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: *Analysis of Variance*

Anti-CD3<sup>+</sup>: Anticorpo anti-CD3<sup>+</sup>

Anti-220<sup>+</sup>: Anticorpo anti-B220<sup>+</sup>

Anti-IgG: Anticorpo anti-IgG

BALB/c: Linhagem de Camundongos

CVD: Deposição Química de Vapor

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Enzima Imunoensaio

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting* (Citometria de Fluxo)

Fc: Fração Cristalizável de Imunoglobulina

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

IgG: Imunoglobulina G

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 Beta

IL-2: Interleucina 2

IL-6: Interleucina 6

LPS: Lipopolissacarídeos

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico

NTCs: Nanotubos de Carbono

NTCPSs: Nanotubos de Carbono de Parede Simples

NTCPDs: Nanotubos de Carbono de Parede Dupla

NTCPMs: Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla

PBS: Tampão Fosfato Salino

PHA: Fitohemaglutinina

SFB: Soro Fetal Bovino

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Suspensões de NTCPMs carboxilados utilizadas em cada grupo de células .....	27
<b>Tabela 2</b> - Especificações da amostra de NTCPMs carboxilados.....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática das áreas envolvidas neste trabalho .....	15
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) NTCPS, (b) NTCPM e (c) NTCPD.....	16
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática dos três diferentes tipos de NTCs formados a partir de uma folha de grafeno .....	17
<b>Figura 4</b> - Esquema da metodologia.....	24
<b>Figura 5</b> - Avaliação dos efeitos dos NTCPMs carboxilados sobre cultura de células .	28
<b>Figura 6 (a) e (b)</b> - Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de NTCPMs carboxilados.....	34
<b>Figura 7</b> - Viabilidade de esplenócitos não tratados e tratados com NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de cultivo celular .....	37
<b>Figura 8</b> - Viabilidade de células da medula óssea não tratados e tratados com NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de cultivo celular.....	37
<b>Figura 9</b> - Proliferação celular de esplenócitos tratados com CpG e tratados com NTCPMs carboxilados após 72 horas de cultivo celular .....	39
<b>Figura 10</b> - Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de esplenócitos em diferentes escalas. (A e B) controle, (C e D) esplenócitos tratados com 10 ng/mL de NTCPMs carboxilados.....	40
<b>Figura 11</b> - Análise de linfócitos T e células B após administração <i>in vivo</i> de NTCPMs carboxilados (A) Gate de linfócitos (B) CD3 controle, (C) CD3 50 µg, (D) CD3 100 µg, (E) B220 controle, (F) B220 50 µg, (G) B220 100 µg .....	42
<b>Figura 12</b> - Produção de anticorpos IgG totais no soro de camundongos tratados e não tratados após 20 dias da administração via intravenosa de NTCPMs carboxilados .....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
2.1 NANOTUBOS DE CARBONO.....	16
2.2.1 Síntese de Nanotubos de Carbono .....	18
2.2.1 Funcionalização de Nanotubos de Carbono.....	19
2.2.2 Influência das Propriedades dos NTCs no Sistema Biológico.....	20
2.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	22
2.3.1 Interação dos NTCs com o Sistema Imunológico.....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
3.1 MATERIAIS .....	24
3.1.1 Equipamentos .....	24
3.1.2 Reagentes .....	25
3.2 Animais.....	26
3.3 Nanotubos de Carbono .....	26
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	26
3.2.1 Teste de Viabilidade Celular.....	26
3.2.2 Teste de Proliferação Celular .....	29
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	29
3.2.4 Citometria de fluxo .....	30
3.2.5 Determinação de Anticorpos IgG Totais.....	30
3.2.6 Análise Estatística dos Resultados .....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>32</b>
4.1 Caracterização dos NTCs .....	32
4.2 Viabilidade Celular .....	34
4.3 Teste de Proliferação Celular .....	38
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	39
4.5 Citometria de fluxo .....	40
4.6 Determinação de Anticorpos IgG Totais.....	43
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>



## 1 INTRODUÇÃO

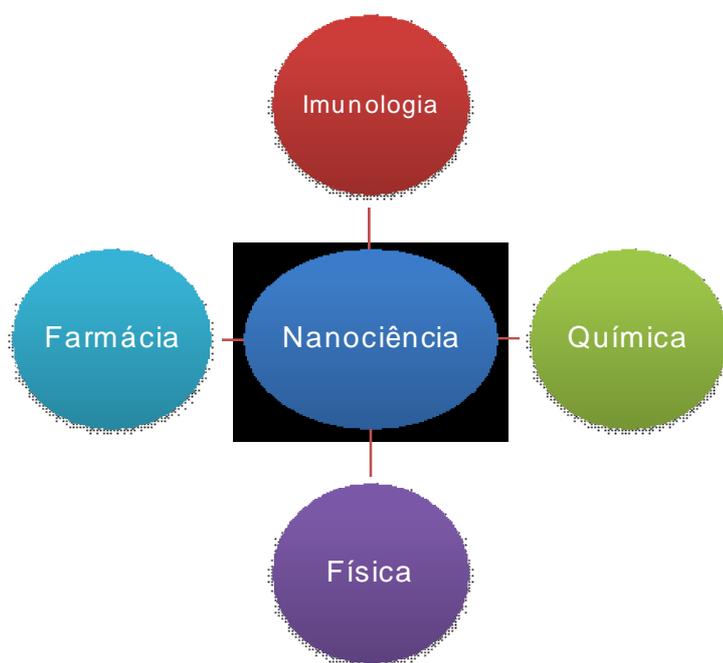
A nanotecnologia é uma área multidisciplinar envolvida na pesquisa e no desenvolvimento de estruturas que possuem pelo menos uma de suas dimensões menor que 100 nm. Nessa escala, as estruturas podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentos diferentes daquelas observadas em escalas maiores (FIORITO *et al.*, 2006).

Ao longo dos próximos anos, o emprego generalizado da nanotecnologia em produtos comerciais e industriais deverá aumentar drasticamente. Isto porque os nanomateriais prometem inovar, melhorando significativamente a qualidade e o desempenho de muitos produtos (THOMAS *et al.*, 2009). Buscando essas melhorias, a nanotecnologia e suas possíveis aplicações, vêm despertando muito interesse na comunidade científica. Na área da saúde, a nanotecnologia possui importante papel no desenvolvimento de biosensores (ZHANG *et al.*, 2007), nanocosméticos (DOWLING, 2004), imunoterápicos, na obtenção de nanoestruturas contendo vacinas ou fármacos (BIANCO *et al.*, 2005). No entanto, antes que tais materiais tenham uma aplicação segura na área biomédica, a toxicidade e biocompatibilidade dos nanotubos de carbono (NTCs) precisam ser completamente investigadas, para que o impacto dessas estruturas na saúde seja benéfico (SMART *et al.*, 2005).

Até o momento, pouco se sabe sobre a interação entre os NTCs e o sistema imune. Ao que tudo indica NTCs quando entram em contato com o meio biológico, possuem uma propensão a serem fagocitados e eliminados por células imunes presentes tanto na corrente sanguínea como nos tecidos. O reduzido tamanho e as exclusivas propriedades físico-químicas destas nanoestruturas podem influenciar a biodistribuição e a forma como ocorrerá a internalização pelas células fagocíticas, tendo como consequência diferentes respostas biológicas. Dessa forma, a investigação de parâmetros imunológicos, tais como viabilidade celular, capacidade proliferativa e estimulação policlonal são apropriados para caracterizar a influência das propriedades dos NTCs sobre a sinalização celular.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPMs) carboxilados sobre células do sistema imunológico *in vitro* e *in vivo*. Cabe ressaltar que a realização desse trabalho foi

possível devido ao caráter interdisciplinar do Mestrado em Nanociências. A integração de conhecimentos específicos da física e da química contribuiu para uma melhor compreensão das propriedades dos NTCs, bem como permitiu a possibilidade de criar alternativas que garantissem sua aplicação de forma adequada nos experimentos celulares propostos neste trabalho (Figura 1).



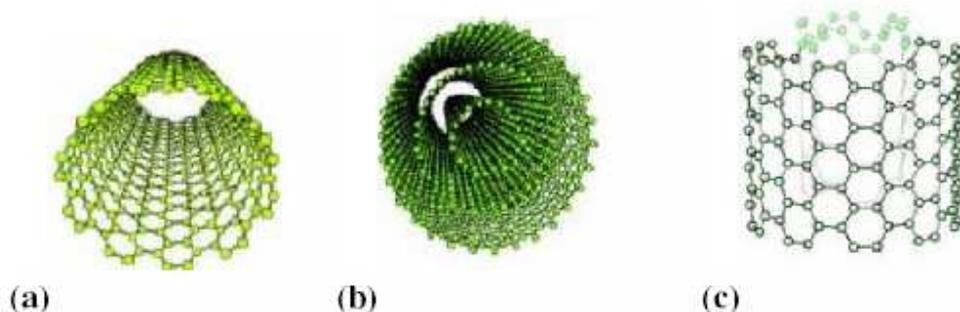
**Figura 1:** Representação esquemática das áreas envolvidas neste trabalho.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 NANOTUBOS DE CARBONO

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da nanotecnologia, as nanoestruturas têm atraído considerável atenção por apresentarem potenciais aplicações nas mais diversas áreas. Entre os diferentes tipos de nanoestruturas, os NTCs talvez sejam os mais representativos, por apresentarem um conjunto de propriedades diferenciadas e singulares (ZARBIN, 2007). Hoje, as nanoestruturas estão sendo utilizadas em computadores quânticos, dispositivos óticos, supercondutores, entre outros produtos industriais (GRABINSKI *et al.*, 2007).

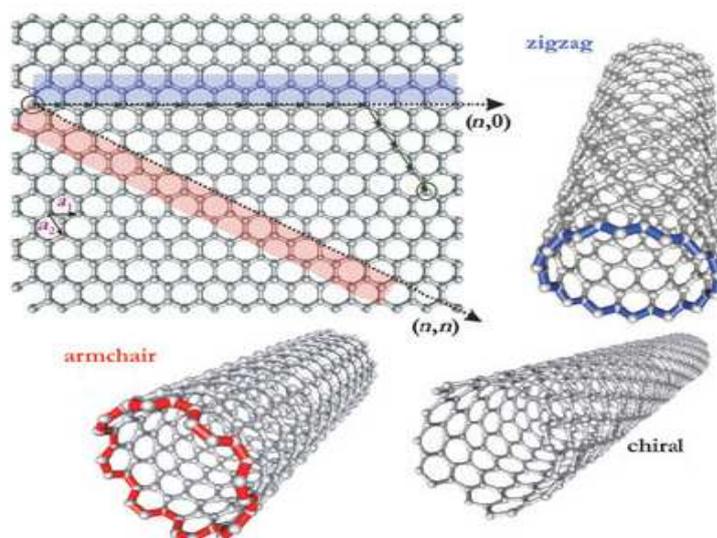
Do ponto de vista estrutural, como mostra a Figura 2, os NTCs podem ser classificados em duas formas: nanotubos multicamadas (“nanotubo de carbono de parede múltipla – NTCPM”) e camada simples (“nanotubo de carbono de parede simples – NTCPS”). Um tipo especial de NTCPMs é o nanotubo de parede dupla (“nanotubo de carbono de parede dupla – NTCPD”) (SOUZA; FAGAN, 2007).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) NTCPS, (b) NTCPM e (c) NTCPD. Adaptado de DRESSELHAUS *et al.* (1998).

Em geral, os nanotubos são caracterizados pela estrutura ordenada, peso ultraleve, alta resistência mecânica, elevada condutividade elétrica e térmica e elevada área superficial (DAI; MAU, 2001).

A maioria das propriedades dos NTCPS depende do seu diâmetro e ângulo "quiral", também chamado helicidade ou quiralidade. Estes dois parâmetros são definidos pelos dois índices  $(n, m)$ . Um NTC pode ser construído teoricamente a partir de uma folha de grafite (grafeno) enrolada de tal forma, que coincidam dois sítios cristalograficamente equivalentes de sua rede hexagonal. O vetor  $\mathbf{C}$  chamado vetor "quiral", que define a posição relativa dos dois sítios é definido mediante dois números inteiros  $(n, m)$  e pelos vetores unitários da rede hexagonal  $\mathbf{a}_1$  e  $\mathbf{a}_2$  ( $\mathbf{C} = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$ ). Um tubo é chamado "armchair" se  $n = m$ , e "zigzag" quando  $m = 0$ . Em todos os outros casos ( $n \neq m \neq 0$ ) os tubos são chamados "quirais" e estão definidos pelo ângulo de helicidade  $\Phi$ . Se  $\Phi$  varia de  $0^\circ$  a  $30^\circ$  podemos gerar tubos partindo do tipo "armchair" até o "zigzag" como limites, passando pelos tubos "quirais" (ROMERO *et al.*, 2002; HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004; DRESSELHAUS, 1996). Em função dos índices  $(n,m)$ , um nanotubo é metálico quando  $n-m$  é múltiplo de 3, em caso contrário é semicondutor. Todos os nanotubos do tipo *armchair* são metálicos, enquanto que os zigzag e quirais podem ser metálicos e semicondutores (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004).



**Figura 3:** Representação esquemática dos três diferentes tipos de NTCs formados a partir de uma folha de grafeno. Adaptado de BALASUBRAMANIAN e BURGHARD (2005).

## 2.2.1 Síntese de Nanotubos de Carbono

Entre os métodos de síntese de NTCs disponíveis atualmente, os mais utilizados são: ablação por laser, descarga por arco e deposição química de vapor (CVD).

O método de ablação por laser está baseado numa descarga elétrica gerada entre dois eletrodos de grafite, porém, um deles (ânodo) está preenchido com partículas metálicas catalisadoras de metais de transição. A alta temperatura entre os eletrodos permite a sublimação do carbono formando-se os nanotubos. Na descarga por arco, o carbono é vaporizado a partir da superfície de um disco de grafite misturado também com metais de transição, utilizando um laser pulsado e focalizado. O alvo de grafite é inserido no meio de um tubo de quartzo mantido numa temperatura controlada da ordem de 1200 °C. Os nanotubos formados são arrastados mediante um fluxo de hélio (He) e posteriormente condensados numa superfície coletora refrigerada de cobre (Co) (ROMERO *et al.*, 2002). Às altas temperaturas utilizadas durante estes processos, possibilita o crescimento de nanotubos com ótimas qualidades estruturais (DAÍ; MAU, 2001). Após o processo de síntese, tanto a técnica de ablação a laser como de descarga elétrica, exigem etapas de purificação para que sejam separadas as impurezas (partículas catalisadoras, carbono amorfo e fulerenos) dos nanotubos (THOSTENSON; REN; CHOU, 2001).

Ao contrário dos métodos de descarga por arco e ablação a laser que utilizam altas temperaturas, o CVD é um método simples e econômico para sintetizar nanotubos em temperaturas relativamente baixas. O método consiste na decomposição térmica de hidrocarbonetos na presença de um metal catalisador (KARTHIKEYAN; MAHALINGAM, 2009). Com o aumento da temperatura, o metal catalisador se aglutina em nanopartículas separadas que servem como centros de crescimento, ficando no topo ou na base do nanotubo (CAPAZ; CHACHAM, 2003). Esse método permite que nanotubos sejam produzidos em grande escala (COUTEAU *et al.*, 2003), cresçam individualmente (MERKOÇI, 2006) e que sejam mais puros que os produzidos por descarga elétrica e ablação a laser (THOSTENSON; REN; CHOU, 2001).

## 2.2.2 Funcionalização de Nanotubos de Carbono

Devido ao caráter hidrofóbico dos NTCs, métodos de funcionalização estão sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar sua biocompatibilidade e solubilidade em solventes aquosos (ZHANG; BAI; YAN, 2010). A funcionalização dos NTCs através de suas paredes pode ser realizada através da adsorção de átomos ou moléculas, dopagens substitucionais, deformações estruturais ou por adsorção de grupos químicos (SOUZA; FAGAN, 2007). Em geral, as reações de funcionalização são divididas em duas categorias: covalente e não covalente.

A funcionalização covalente é caracterizada pela formação de uma ligação covalente entre o grupo funcional e a superfície do NTC (MENG; FU; LU, 2009) e pode ser obtida através de processos oxidativos ou pela reação de adição de grupos funcionais (TASIS *et al.*, 2003). No primeiro método, são utilizadas soluções fortemente ácidas capazes de quebrar e revestir com grupos carboxílicos (-COOH) as pontas e os pontos de defeito dos NTCs (BALASUBRAMANIAN; BURGHARD, 2005). O grupo carboxila pode também ser utilizado para incorporar outros grupos funcionais (SUN *et al.*, 2002). No segundo método, uma ampla variedade de moléculas, incluindo peptídeos, ácidos, aminas, polímeros e outros agentes terapêuticos podem ser covalentemente ligados às paredes dos NTCs (SMART *et al.*, 2005). A presença de grupos químicos na superfície dos NTCs pode modificar as suas propriedades físico-químicas (PIRET *et al.*, 2010).

A funcionalização não covalente está baseada na interação fraca entre os sistemas adsorvidos e o NTC (MENG, 2009). Este método tem como vantagem manter a estrutura aromática dos NTCs e assim suas propriedades eletrônicas. Além disto, a estrutura original do NTC pode ser facilmente recuperada para outros tipos de aplicações ou até mesmo para reutilização destes nanomateriais. Atualmente, são utilizados surfactantes, polímeros e biopolímeros (ácidos nucleicos e peptídeos) neste tipo de funcionalização (KLUMPP *et al.*, 2006).

Além do processo de funcionalização, métodos de sonicação também estão sendo utilizados a fim de evitar a formação dos aglomerados de NTCs em soluções aquosas (SMART *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Influência das Propriedades dos NTCs no Sistema Biológico

Embora existam muitas aplicações e perspectivas para a utilização dos NTCs na área biomédica, ainda não estão esclarecidos os mecanismos de interação com os sistemas biológicos. Normalmente, os efeitos prejudiciais das nanoestruturas surgem da combinação de vários fatores, entre eles a forma, o tamanho, estado de aglomeração, solubilidade e as propriedades de superfície (STERN; McNEIL, 2007).

Segundo Magrez e colaboradores (2006), a forma das nanoestruturas pode influenciar na toxicidade celular. Neste estudo, foi investigada a toxicidade dos NTCPMs, fibras de carbono e nanopartículas de carbono colocados em contato com uma linhagem de célula tumoral retirada do pulmão humano. O resultado mostrou que a citotoxicidade decresceu na seguinte sequência: nanopartículas de carbono, fibras de carbono e NTCPMs. Este resultado foi evidenciado pelo número de células viáveis e também pela quantidade de restos celulares encontrados no meio de cultura. Através do exame microscópico, observou-se que ao contrário das células do controle, as células expostas às nanoestruturas apresentaram alterações morfológicas típicas de morte celular como eosinofilia do citoplasma e picnose nuclear.

Dependendo das condições de síntese, os NTCs podem variar significativamente no comprimento e no diâmetro. O comprimento pode ser controlado pelo tempo de síntese (quanto maior o tempo, maior será o comprimento), enquanto o diâmetro pode ser controlado pelo tamanho do metal utilizado como catalisador (FOLDVARI; BAGONLURI, 2008). Nos sistemas biológicos o tamanho pode interferir na absorção, distribuição, metabolismo e na excreção das nanoestruturas (JIANG, 2009). Ao contrário das partículas convencionais de maior diâmetro médio, as nanoestruturas abaixo de 100 nm podem ser potencialmente mais tóxicas, podem redistribuir-se a partir do seu sítio de deposição, escapar das defesas fagocíticas normais, modificar a estrutura de proteínas, ativar respostas inflamatórias e imunológicas e com isso afetar a função normal dos tecidos (LACERDA *et al.*, 2006). Conforme o método de síntese utilizado, os NTCs podem apresentar na sua superfície altos níveis de metais tóxicos, sendo estes vistos como contaminantes. Entre os metais utilizados estão o cobre (Co), ferro (Fe), níquel (Ni) e molibdênio (Mo), sendo que todos possuem efeitos tóxicos

documentados (DONALDSON *et al.*, 2006). Em muitos casos, as toxicidades associadas com as nanoestruturas têm sido atribuídas aos contaminantes que adsorvem à superfície da partícula durante a sua fabricação e não ao nanomaterial em si (STERN; McNEIL, 2007). Segundo alguns estudos, a presença de NTCs associados à metais no interior das células e dos tecidos geram uma resposta inflamatória. As espécies oxidativas formadas durante o processo inflamatório podem interagir com os metais e provocar a destruição de antioxidantes endógenos (FIRME; BANDARU, 2009). Com isso, ocorre um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes provocando alterações nas proteínas, lipídios e no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células (HALLIWELL *et al.*, 1999).

A elevada área superficial é uma característica que depende exclusivamente do tamanho das nanoestruturas. Quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior será o número de átomos na sua superfície e, portanto, maior será a sua reatividade química (HALLOCK *et al.*, 2009). Esta propriedade proporciona à nanoestrutura uma maior área de contato com as membranas celulares e as proteínas, bem como uma grande capacidade de absorção e transporte de substâncias bioativas (YU *et al.*, 2008). Além disso, a força eletrostática e a força de Van der Waals presentes na superfície dos nanotubos favorecem a formação de aglomerados (OSBERDÖRSTER *et al.*, 2005).

Quanto à solubilidade dos nanotubos, Yang e colaboradores (2007) demonstraram que  $^{13}\text{C}$ -NTCPS não funcionalizados dispersos em solução aquosa contendo 1% de Tween 80 foram rapidamente eliminados da corrente sanguínea e distribuídos para a maioria dos órgãos após serem administrados por via intravenosa. Ao longo dos 28 dias de experimento, foi observado um acúmulo dos  $^{13}\text{C}$ -NTCPS não funcionalizados, em níveis relativamente elevados, no pulmão, fígado e baço. Amostras de fezes e urina foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e indicaram que houve pouca excreção dos  $^{13}\text{C}$ -NTCPS. Por outro lado, Singh e colaboradores (2006) demonstraram que NTCPSs e NTCPMs funcionalizados com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e índio ( $^{111}\text{In}$ ) foram excretados de forma intacta na urina após serem administrados por via intravenosa. Estes resultados sugerem que funcionalização dos NTCs melhora a biocompatibilidade, diminui a toxicidade e impede que os aglomerados se acumulem dentro de células, órgãos e

tecidos (DUMORTIER *et al.*, 2006).

## 2.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO

### 2.3.1 Interação dos NTCs com o sistema imunológico

A resposta imunológica é dividida em dois tipos principais, a imunidade inata e a imunidade adaptativa, elas se diferenciam principalmente no tempo de resposta, tipos celulares participantes e capacidade de gerar memória imunológica. As células são geradas em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) e amadurecem e se especializam em órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos e coleções difusas) (ABBAS; LICHTMAN 2005).

Alguns estudos demonstram que os NTCs são bons candidatos para aplicação em sistemas vacinais e como adjuvantes imunológicos. Quando peptídeos imunogênicos são ligados covalentemente aos NTCs, uma forte resposta de anticorpos específicos para o peptídeo ligado é formada (PANTAROTTO *et al.*, 2003a; PANTAROTTO *et al.*, 2003b). As razões para o desenvolvimento dessa resposta forte podem estar relacionadas com elementos da imunidade inata e/ou adaptativa.

Na resposta imune inata foram realizados estudos da interação de NTCs com proteínas do sistema complemento humano. Nessa análise foi observado que os NTCs ativam tanto a via clássica quanto a alternativa do sistema complemento, um mecanismo mediado pela interação da proteína C1q com essas nanoestruturas (SALVADOR-MORALES *et al.*, 2006). Corroborando com esses resultados, estudos mais recentes demonstraram que mesmo altas doses (300 µg/mL) de NTCs na linhagem celular RAW 264.7 (célula apresentadora de antígeno) não influenciaram a funcionalidade dessas células *in vitro*, baseando-se na expressão de citocinas e quimiocinas de padrão inflamatório (interleucina-1β (IL-1β), CXCL-9, MIP-1α, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina (IL-6)) (PALOMÄKI *et al.*, 2010).

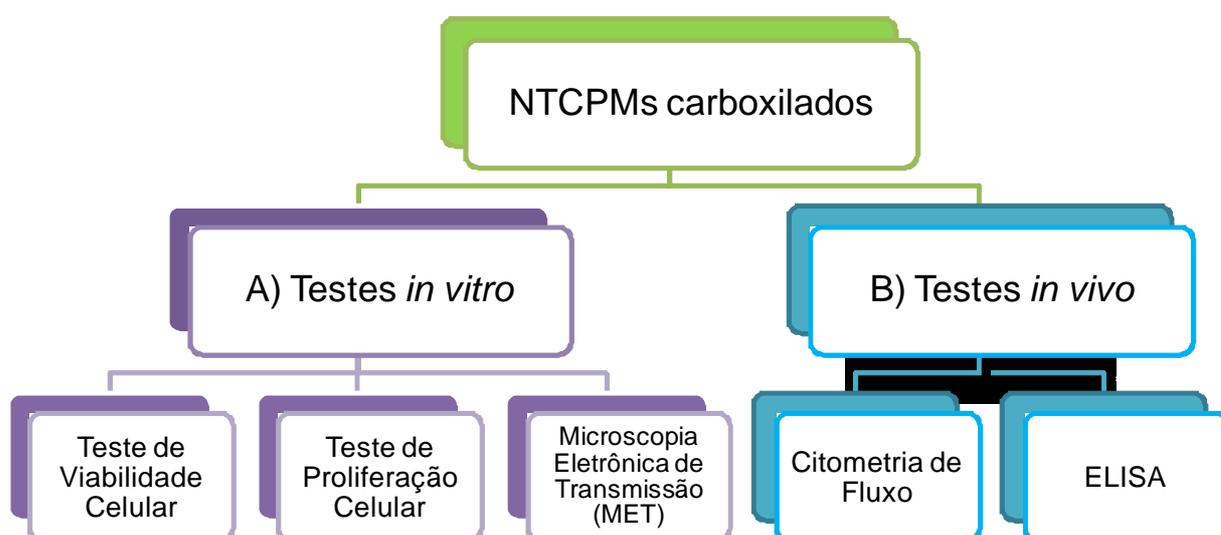
A influência dos NTCs na resposta imune adaptativa ainda não foi muito investigada. Alguns estudos priorizam a viabilidade e proliferação de linfócitos T e B, assim como padrão de citocinas T helper 1 e T helper 2. Em linhagem de linfócitos T humanos os NTCs não funcionalizados e oxidados induzem morte celular mediada por

apoptose em um processo dose-dependente. Nesse caso foi observado que os NTCs localizam-se dentro das células que sofrem esse processo (BOTTINI *et al.*, 2006). Já em linfócitos B de camundongos foi observada uma possível resposta alérgica através da ativação dessas células induzidas por citocinas T helper 2 (PARK *et al.*, 2009).

Assim, a interação de NTCs com o sistema imunológico ainda está em fase de investigação, pois além dos efeitos serem controversos entre células de humanos e cobaias experimentais (modelos para estudo da resposta imune), os mecanismos moleculares intracelulares não foram desvendados.

### 3 METODOLOGIA

A seguir, apresentaremos detalhadamente todos os materiais e procedimentos envolvidos neste trabalho. A Figura 4 mostra um esquema da metodologia desenvolvida fazendo uso de NTCPMs carboxilados para testes *in vivo* e *in vitro* utilizados em diferentes tipos de cultura de célula.



**Figura 4: Esquema da metodologia:** A) NTCPMs carboxilados foram dispersos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e utilizados para o cultivo de diferentes tipos de células mamíferas. Após cultivo, as células foram avaliadas quanto à viabilidade, nível de proliferação e interação com as células. B) NTCPMs carboxilados foram injetados na veia caudal de camundongos BALB/c. O número de linfócitos T e células B total foi analisado por citometria de fluxo e a quantidade de anticorpos totais da classe IgG determinada por ELISA no soro.

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Equipamentos

- Autoclave Vertical – Phoenix;
- Balança analítica AX 200 – Shimadzu;
- Capela de fluxo laminar vertical – Pachane Pa 310;
- Câmara de Neubauer – Optik Labor;

- Centrífuga refrigerada – NT 815 Novatécnica;
- Estufa de CO<sub>2</sub> – Laboven;
- Máquina de gelo – Eurfrigor;
- Microcentrífuga refrigerada – NT 805 Novatécnica;
- Microscópio de Transmissão de Elétrons – JEOL JEM-1220;
- Microscópio óptico – Olympus CX 31;
- Citômetro de Fluxo – FACScalibur Beckton Dickson;
- Leitora de ELISA - TR- Reader
- Micropipeta com volume de 0,2-2 µL, 2-20 µL, 20-200 µL e 200-1000 µL – Gilson;
- Estufa bacteriológica – Novatécnica.

### 3.1.2 Reagentes e outros materiais

- Reagente de revelação TMB – Bio-Rad;
- Anticorpo anti-CD3 conjugado a FITC – &Bioscience;
- Anticorpo anti-B220 conjugado a Cyron – &Bioscience;
- Anticorpo anti-IgG conjugado a peroxidase – &Bioscience;
- Ácido dimetilsulfóxido – Nuclear;
- Corante azul tripan 0,4 % – GIBCO;
- RPMI (Meio de cultura) – GIBCO;
- Sal sulfato de gentamicina – Sigma Aldrich;
- Soro fetal bovino (SFB) – GIBCO;
- Fosfato de sódio monobásico anidro – Nuclear;
- Fosfato de potássio – Synth;
- Dimetilsulfóxido – Nuclear;
- Cloreto de potássio – Vetec;
- Cloreto de sódio – Nuclear;
- Cloreto de amônio – Vetec;
- Bicarbonato de sódio – Vetec;
- Ácido clorídrico – Nuclear;

- Tris-HCl – Tris Purê™ Tris Invitrogen;
- Oligonucleotídeo CpG – Invitrogen;
- Reagente MTT - (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) – Invitrogen;
- Placa para cultura de 24 poços – TPP;
- Placa de ELISA de 96 poços – TPP;
- Seringa de insulina – Becton Dickinson (BD);
- Tubos cônicos para centrifugação 15 e 50 mL – TPP;

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas com idade entre 12 - 15 semanas e peso entre 25 a 30 g, adquiridos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Os camundongos foram mantidos no biotério, em ciclo claro/escuro natural e em sala com controle de temperatura de 20 - 25 °C, com água e ração padrão.

### 3.3 Nanotubos de Carbono

Os NTCPMs utilizados neste trabalho foram funcionalizados e caracterizados pelo Laboratório de Química do Estado Sólido da Universidade Estadual de Campinas (LQES/UNICAMP). A amostra de NTCPMs carboxilados foi sintetizada pelo método CVD e caracterizada através das seguintes análises: espectroscopia de energia dispersiva de raios X, espectroscopia Raman, análise termogravimétrica, potencial zeta, microscopia eletrônica de tunelamento e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A amostra de NTCPMs foi funcionalizada através da técnica de refluxo e agitação magnética, porém a descrição da metodologia não foi fornecida pelo LQES.

## 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular foi realizado com esplenócitos e células de medula

óssea femural. Todo o material cirúrgico utilizado, como tesouras e pinças foram desinfetados com álcool 70% e esterilizados com autoclave. Dois camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os tecidos removidos. O processo foi realizado com procedimentos que garantissem a esterilidade e conservação celular.

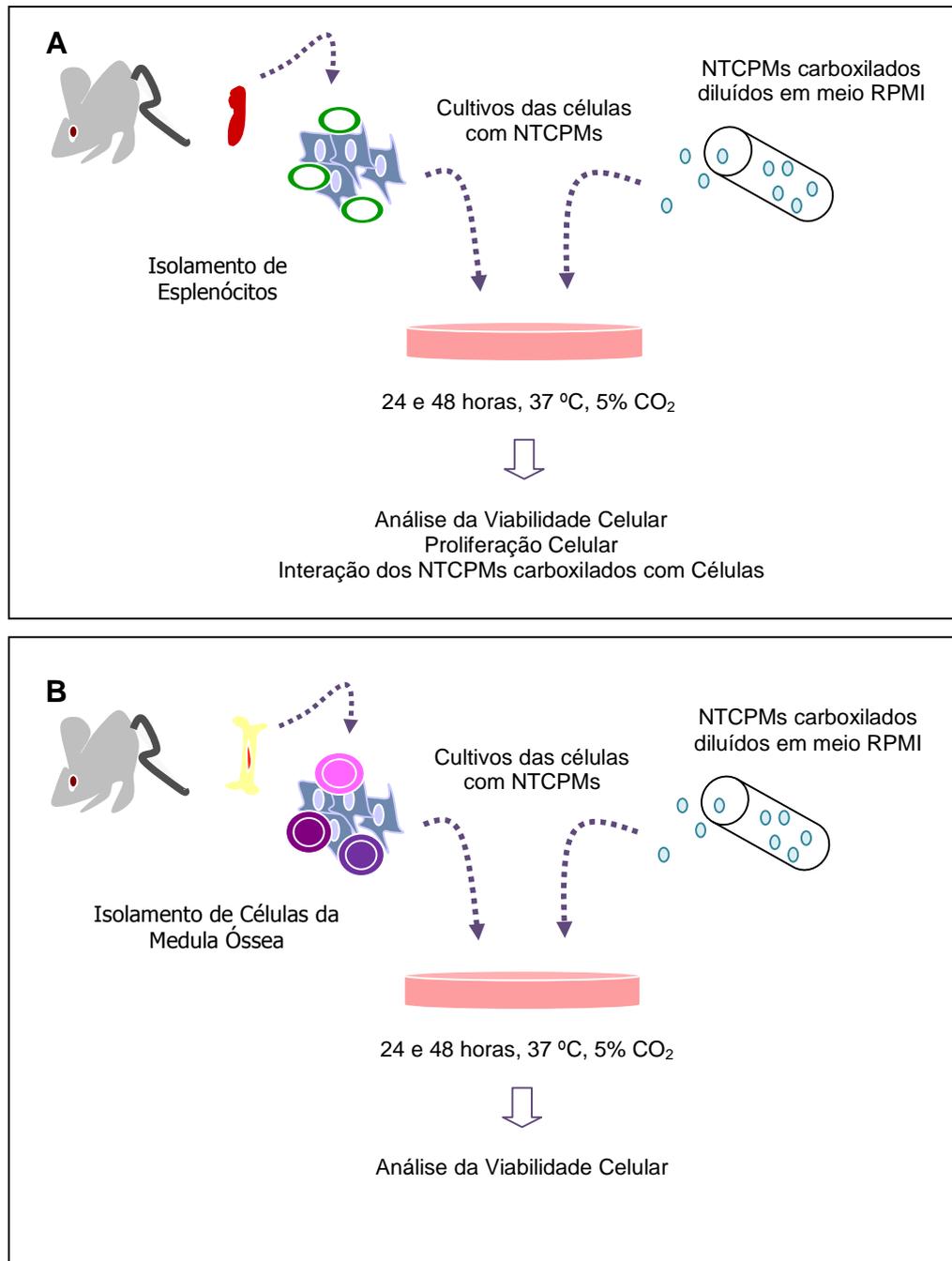
Para o teste com esplenócitos, os baços foram macerados e a suspensão de células obtida foi filtrada em tela e lavada com meio RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino (SFB). As hemácias foram lisadas com tampão de lise (8,26 mg/mL NH<sub>4</sub>Cl, 1mg/mL KHCO<sub>3</sub> e 0,037 mg/mL EDTA) por 2 minutos a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e 2 x 10<sup>6</sup> células/mL transferidos para cada poço da placa de cultura celular com 24 poços e cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de SFB por 24 e 48 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Um esquema do experimento é apresentado na Figura 4A.

Para o estudo com precursores medulares, o osso femural foi isolado e as epífises cortadas. Com auxílio de uma seringa, a medula foi extraída pela passagem de um fluxo de meio RPMI 1640 com 10% SFB pelo canal medular. As células obtidas foram filtradas em tela e lavadas com meio de cultura. Após a lavagem, as células foram diluídas em meio e alíquotas contendo 2 x 10<sup>6</sup> células/mL foram transferidas para cada poço da placa de cultura celular com 24 poços e cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de SFB por 24 e 48 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Um esquema do experimento é apresentado na figura 4B.

O estudo foi realizado em triplicata e os tratamentos foram distribuídos nas placas, conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Suspensões de NTCPMs carboxilados utilizadas em cada grupo de células.

<b>Grupo de Células</b>	<b>Meio de Cultura</b>	<b>Concentração NTCPMs</b>
Controle	RPMI 1640/10% SFB	-----
1	RPMI 1640/10% SFB	1 ng/mL
2	RPMI 1640/10% SFB	5 ng/mL
3	RPMI 1640/10% SFB	10 ng/mL



**Figura 5: Avaliação dos efeitos dos NTCPMs carboxilados sobre cultura de células:** Baço (4A) ou medula (4B) de camundongos foram isolados. As células foram cultivadas com meio de cultura RPMI 1640 com 10% SFB (controle) e RPMI 1640 com 10% SFB contendo 1ng/mL, 5 ng/mL ou 10 ng/mL de NTCPMs carboxilados. Após 24 e 48 horas de cultivo, foram analisadas a viabilidade celular, proliferação e interação dos NTCPMs carboxilados com as células.

O número de células e as concentrações das suspensões contendo NTCPMs funcionalizados foram utilizadas como estabelecido por Bottini e colaboradores (2006). Transcorrido 24 e 48 horas de cultivo celular, foi realizada a contagem das células da medula óssea e dos esplenócitos viáveis através da técnica de exclusão do azul de tripan 0,4% na Câmara de Neubauer.

### 3.2.2 Teste de Proliferação Celular

O teste de proliferação celular foi determinado pelo método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). O processo de separação dos esplenócitos foi realizado conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. Aliquotas contendo  $1 \times 10^4$  células/mL foram transferidas para cada poço da placa de cultura celular com 96 poços e cultivadas por 72 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi utilizado como controle negativo, enquanto o oligonucleotídeo CpG (adjuvante sintético) como controle positivo. Para o preparo da solução de MTT, foram diluídos 5 mg do pó em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução de MTT em cada poço da placa, sendo mantidos sob agitação por 5 minutos a 150 RPM. Após 2 horas de incubação em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C foram acrescentados 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço da placa e esta reincubada por 10 minutos. As análises foram realizadas em leitora de ELISA espectrofotométrica com comprimento de onda de 570 nm. O método utilizado foi adaptado de Mosmann (1983). As culturas foram feitas em triplicata e o número de células utilizadas no estudo foi adaptado de Monteiro-Riviere e colaboradores (2009).

### 3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras de esplenócitos enviadas para a análise foram preparadas conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. As análises feitas por MET 120 kV foram realizadas pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS). O processo de emblocamento da amostra foi realizado na seguinte ordem: fixação química (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão fosfato 0,12 M em p.H 7,2-7,4), lavagem (tampão fosfato 0,1M), pós fixação (tetróxido de ósmio 2%, tampão fosfato 0,2M (1:1)), lavagem (tampão fosfato 0,1M), desidratação

(acetona P.a), pré-embecção (desidratante e resina), embecção (resina 100%) e inclusão (silicone e resina pura).

#### 3.2.4 Citometria de Fluxo

Para a análise da resposta imunológica *in vivo* aos NTCPMs carboxilados, foram utilizados três grupos, sendo cada um composto por três camundongos. Os animais foram aquecidos com lâmpada por um período de 10 minutos para dilatação do sistema vascular. Em seguida, foram imobilizados em suporte específico e com auxílio de uma seringa de insulina, foi administrado um volume de 50 e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de nanotubos carboxilados (1 mg/mL) na veia caudal. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle, sendo administrados 100  $\mu\text{L}$  de PBS na veia caudal. Os animais foram observados por 10 minutos, em função da possibilidade de efeitos adversos. Não foi adotado nenhum procedimento prévio ou posterior nos animais (dieta ou anestesia). As doses dos NTCPMs carboxilados administradas foram previamente estabelecidas em estudo realizado por Yang e colaboradores (2008).

Transcorridas 24 horas, os animais foram sacrificados e as células do baço isoladas conforme descrito no item 3.2.1. A marcação celular para a citometria de fluxo foi realizada com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Após bloqueio dos receptores da fração constante de imunoglobulina (Fc) com FC blocking (sobrenadante de células 2.4G2) por 20 minutos, as células foram marcadas (1  $\mu\text{L}/10^6$  células) com anti-CD3<sup>+</sup> conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anti-B220<sup>+</sup> conjugado a cychron, por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur Beckton Dickson.

#### 3.2.5 Determinação de Anticorpos IgG Totais

Para analisar uma possível influência dos NTCPMs funcionalizados na resposta secundária, foram avaliados os níveis de anticorpos IgG totais no soro de camundongos. O estudo utilizou três grupos, sendo cada um composto por três camundongos. O processo de administração dos NTCPMs carboxilados foi realizado conforme descrito anteriormente no item 3.2.4. Após 20 dias, os camundongos receberam um estímulo com as mesmas doses e 48 horas depois o sangue foi retirado

da veia retroorbital e o plasma separado por centrifugação a 700 RPM. O plasma foi armazenado a temperatura de 4 °C até utilização. Placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com o plasma puro ou diluído na proporção de 1:1000 e 1:2000 em PBS. O volume final de cada poço foi de 100 µL e as placas foram mantidas à temperatura de 4 °C por 15 horas. Para o controle positivo, foi utilizado anti-IgG1 purificado por cromatografia em coluna de proteína A. Em seguida, as placas sensibilizadas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20 (tampão de lavagem) e os poços incubados por 2 horas com 300 µL de tampão de bloqueio (PBS, 0,05% Tween 20, 5% leite desnatado). As placas foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, na concentração de 1:1000 por um período de 1 hora. O excesso de conjugado foi removido com 5 lavagens com tampão de lavagem e o ELISA revelado com 100 µL em cada poço do reagente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por 20 minutos. A reação foi parada com HCl 0,1 N e a absorbância determinada em leitora de ELISA espectrofotométrica no comprimento de onda de 450 nm.

### 3.2.6 Análise Estatística dos Resultados

A metodologia estatística dos dados incluiu análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterização dos Nanotubos de Carbono

Segundo as especificações enviadas pelo LQES, os NTCPMs carboxilados utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo método CVD. Apresentam 1,2% de impurezas metálicas e são constituídos por C, O e Fe. O diâmetro varia entre 10 e 40 nm e o comprimento menor que 10 nm. As especificações da amostra podem ser vistas na Tabela 2.

Para avaliar as características estruturais e a qualidade da amostra, foram realizadas análises de MET e MEV pelo LQES. A Figura 6 mostra imagens da amostra de NTCPMs carboxilados obtidas por MET em diferentes escalas (a) 100 nm e (b) 500 nm.

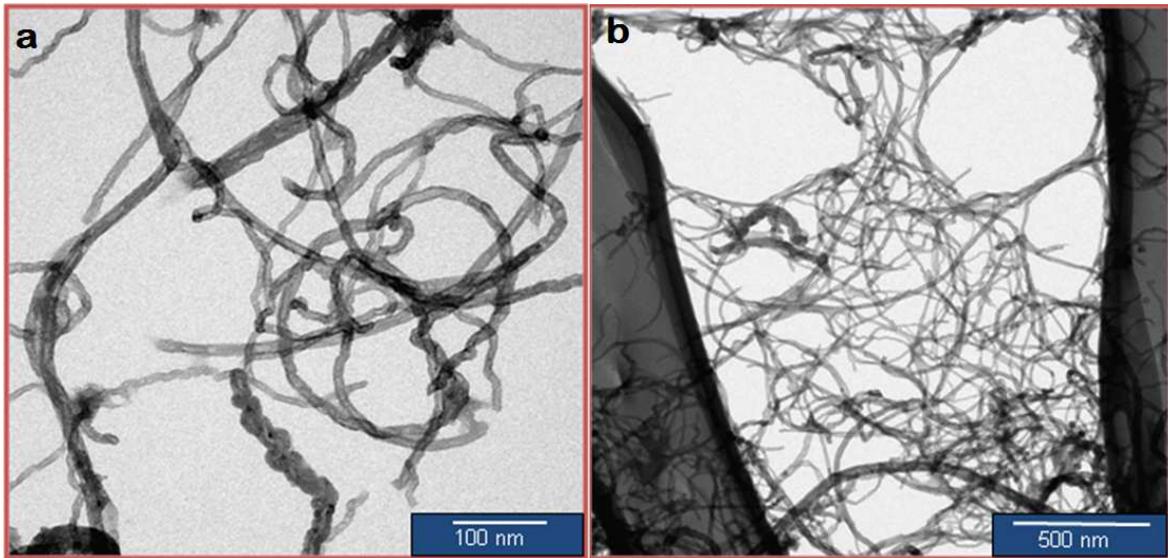
Inicialmente, nossos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados com NTCPMs não funcionalizados (Sigma Aldrich). Entretanto, a insolubilidade destes nanotubos de carbono em solventes aquosos, dificultou o desenvolvimento dos experimentos celulares, bem como sua administração por via intravenosa. Na tentativa de se obter uma melhor dispersão dos NTCPMs não funcionalizados em PBS e em meio de cultura RPMI 1640, foi realizado o processo de ultrasonicação (40 kHz) por 30 minutos. A sonicação é um método comumente utilizado para separar agregados de NTCs em solução, uma vez que a dispersão ocorre rapidamente, sem a necessidade de qualquer modificação química (HILDING *et al.*, 2003). Imediatamente após este processo, os NTCPMs não funcionalizados apresentaram boa dispersão tanto em PBS quanto em meio de cultura RPMI 1640, porém, após alguns minutos, pode-se observar sinais de precipitação. Alguns autores sugerem a utilização de surfactantes (Tween, dodecilsulfato de sódio (SDS), Triton X-100, dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS)) como agentes dispersantes de NTCs não funcionalizados (YANG *et al.*, 2007 ; PIRET *et al.*, 2010). No entanto, por serem compostos detergentes, os surfactantes são incompatíveis com a cultura de células e, além disso, alteram substancialmente as propriedades intrínsecas dos NTCs (JIA *et al.*, 2005).

Sendo assim, o processo de funcionalização é extremamente importante e necessário para o trabalho em cultura, já que através desta técnica é possível obter

suspensões mais homogêneas e estáveis. Cabe ainda ressaltar que a técnica de oxidação por ácidos fortes utilizada pelo LQES para funcionalizar a amostra de NTCPMs, contribui para a remoção de grande parte das impurezas metálicas (KLUMPP *et al.*, 2006) provenientes do processo de síntese. Devido a isto, o alto teor de pureza da amostra de NTCPMs pode ter colaborado para a ausência de toxicidade evidenciada em nossos resultados.

**Tabela 2:** Especificações da amostra de NTCPMs carboxilados.

Método de síntese	CVD	NTCPMs C100 CNT.Co. Ltda
Análise elementar qualitativo	C, O, Fe	Espectroscopia EDX/JEOL
Área de superfície (Método BET)	250 g/m <sup>2</sup>	ASAP/Micrométricos
Carga de superfície	- 26 ± 5 mV	Potencial Zeta/Malven
I <sub>D</sub> /I <sub>G</sub>	1,38	Espectroscopia de Raman
Temperatura de oxidação	585 °C	TGA/TA SDT Q600
Resíduo metálico final	1,2%	Microbalança/Perkin - Elmer
Diâmetro	10 – 40 nm	MET/Carl Zeiss CEM - 902
Comprimento	< 10 nm	MEV/FEI NanoLab200



**Figura 6 (a) e (b):** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de NTCPMs carboxilados.

#### 4.2 Teste de Viabilidade Celular

Atualmente, os ensaios celulares são considerados essenciais para avaliar a toxicidade e a biocompatibilidade de biomateriais. Isto porque amostras contendo células vivas e mortas podem fornecer uma estimativa da resposta celular frente a uma determinada substância (JONES; GRAINGER, 2009). Baseado nisso, esse estudo teve como objetivo avaliar *in vitro*, os possíveis efeitos causados pelos NTCPMs carboxilados sobre a frequência de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos.

Esplenócitos são células maduras do sistema imunológico, localizados na polpa branca do baço, sendo renovados constantemente. Em razão do seu grau de maturação, essas células apresentam receptores específicos diferentes daqueles em estágios iniciais da vida celular, logo respondem de forma diferente a determinados estímulos. Nesse experimento, os esplenócitos foram utilizados porque são as células que primeiramente entram em contato com antígenos provenientes do sangue (ABBAS; LICHTMAN 2005). Na Figura 7, é apresentado o resultado da viabilidade de esplenócitos frente a diferentes concentrações de NTCPMs em diferentes tempos.

Ao analisar a Figura 7, percebe-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos de células tratadas com as suspensões de NTCPMs.

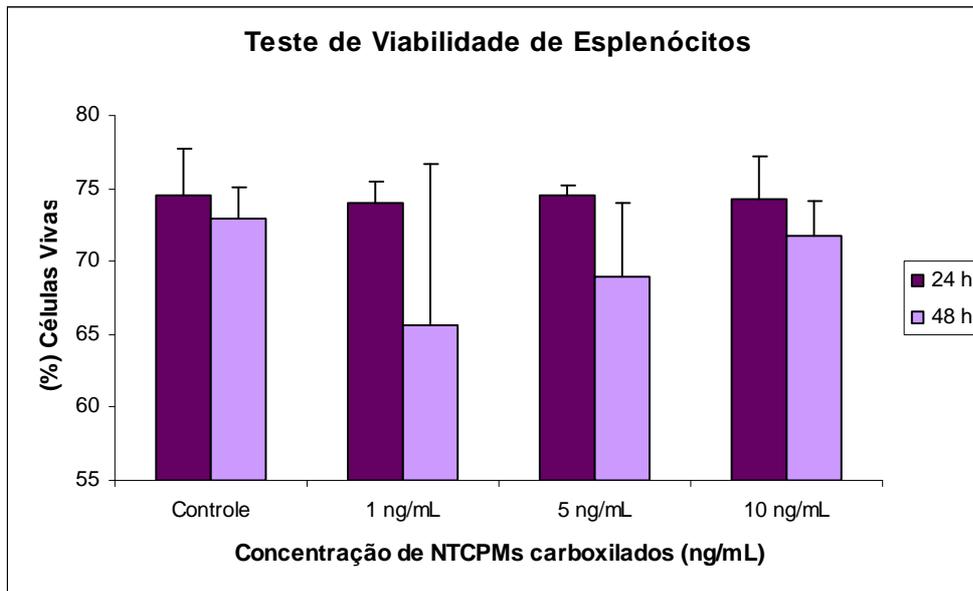
Embora estes resultados não expressem alterações significativas, pode-se verificar um aumento na frequência de esplenócitos viáveis diretamente proporcional às concentrações das suspensões de NTCPMs carboxilados no tempo de 48 horas. Já a queda na frequência de células, no tempo de 48 horas observada principalmente nos grupos tratados era esperada, pois células em cultura necessitam de fatores estimulantes para sobreviver, como por exemplo, a interleucina-2 (IL-2) (GAFFEN; LIU, 2004). Segundo Zeinali e colaboradores (2009), NTCPs carboxilados em diferentes concentrações (5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) não causam alteração significativa na viabilidade de esplenócitos após 24 horas de incubação.

As células da medula óssea apresentam os primeiros precursores das células do sistema imunológico (JANEWAY *et al.*, 2006), principalmente células dendríticas imaturas. Palomäki e colaboradores (2010), avaliaram *in vitro* a viabilidade de células dendríticas provenientes da medula óssea de camundongos após serem expostas a diferentes concentrações (3, 10 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de NTCs não funcionalizados por 24 horas. O resultado apresentado nesse estudo mostra que os NTCs não funcionalizados são tóxicos para as células dendríticas e que a citotoxicidade é diretamente proporcional à dose. A partir disso, foi realizada uma análise dos possíveis efeitos causados pelos NTCPMs funcionalizados em precursores medulares de camundongos. A Figura 8 mostra a viabilidade das células medulares não tratadas e tratadas com NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações e tempos. É possível observar que no grupo de células não tratadas e tratadas com NTCPMs carboxilados nas concentrações de 1 e 5  $\text{ng}/\text{mL}$ , a frequência de células no tempo de 24 horas é maior que no tempo de 48 horas. No entanto, quando comparada a frequência de células tratadas com NTCPMs carboxilados na concentração de 10  $\text{ng}/\text{mL}$ , percebe-se uma inversão na frequência celular entre os tempos de 24 e 48 horas. Por isso, é necessário que um novo experimento seja realizado para confirmar este resultado.

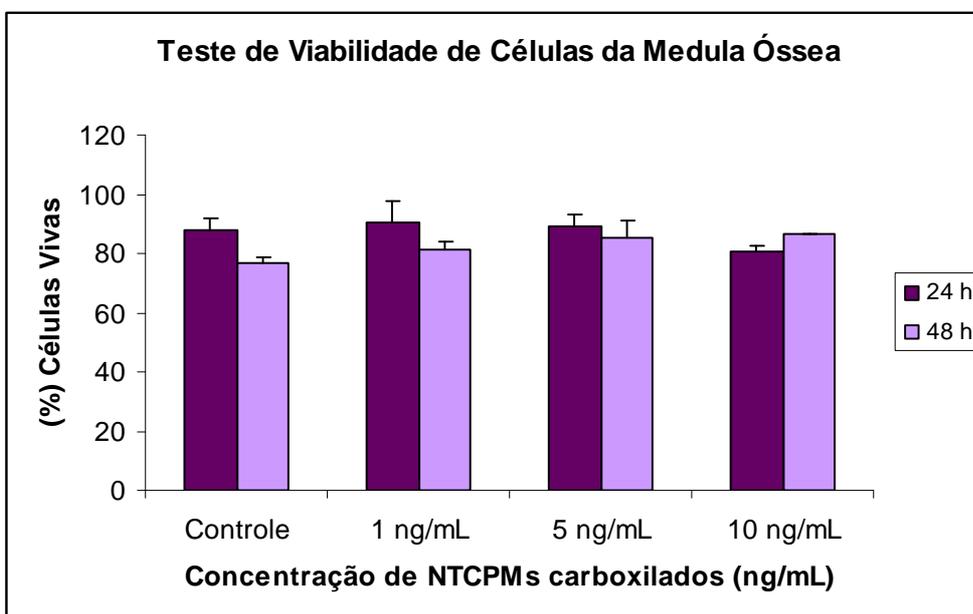
Contudo, nossos resultados iniciais indicam que os NTCPMs carboxilados utilizados neste estudo não alteram de forma significativa a frequência de células maduras do sistema imunológico, assim como os precursores sanguíneos, quando comparado ao grupo controle.

Da mesma forma, Dumortier e colaboradores (2006) avaliaram a citotoxicidade

de dois tipos de NTCPSSs funcionalizados com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e índio ( $^{111}\text{In}$ ) em macrófagos, linfócitos T e linfócitos B de camundongos. As células tratadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de NTCPSSs funcionalizados foram incubadas por 24 horas, enquanto que as tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  foram incubadas por 48 horas. Decorrido este período, não foi observada qualquer alteração significativa na viabilidade celular dos três tipos de células quando comparadas com as células não tratadas. Em uma análise comparativa com células humanas Wang e colaboradores (2009), avaliaram os efeitos dos NTCPMs carboxilados em células humanas dendríticas de sangue periférico humano. Neste estudo, foram utilizados NTCPMs carboxilados com diferentes diâmetros (10-20 nm, 20-40 nm, 40-60 nm ou 60-100 nm) e concentrações (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Essas células foram estimuladas com NTCPMs carboxilados, e os resultados mostraram que não houve diferença significativa na viabilidade celular comparada com células não tratadas. Foi analisada também a expressão de alguns marcadores de superfície celular, tais como CD83, CD86, CD80 e MHC II. Neste caso, pode-se observar que o aumento da expressão desses marcadores foi devido ao lipopolissacarídeo (LPS) associado ao NTCPMs carboxilados. Considerando essa hipótese, é provável que o ligeiro aumento na viabilidade dos esplenócitos após 48 horas, seja resultado da presença de LPS contaminante na amostra de nanotubos. Essa possível contaminação não foi avaliada nesse momento.



**Figura 7:** Viabilidade de esplenócitos não tratados e tratados com NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de cultivo celular.



**Figura 8:** Viabilidade de células da medula óssea não tratadas e tratadas com NTCPMs carboxilados em diferentes concentrações após 24 e 48 horas de cultivo celular.

### 4.3 Teste de Proliferação Celular

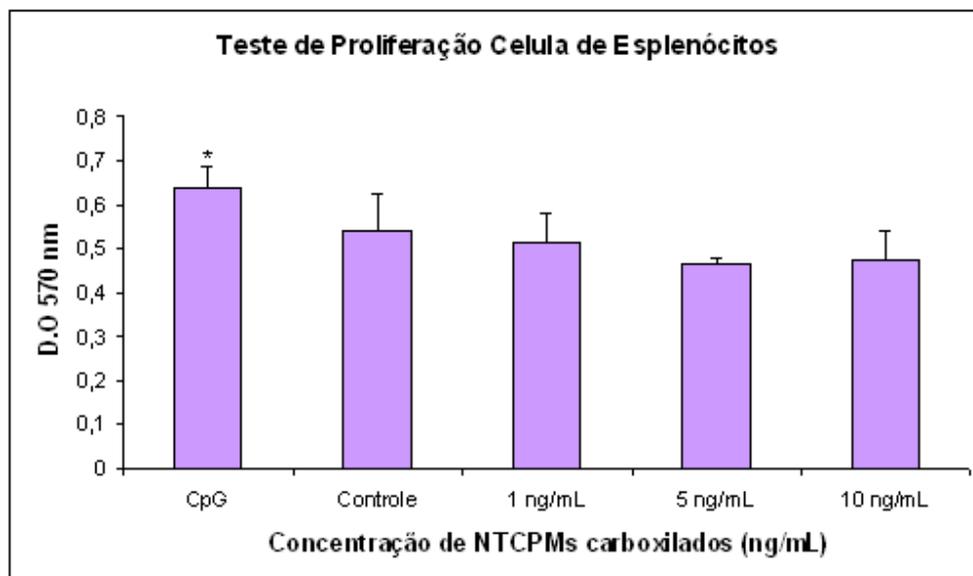
Após ter sido desenvolvido o teste de viabilidade com esplenócitos, foi realizado o teste de proliferação celular. O teste de viabilidade tem como finalidade indicar a frequência celular, entretanto, não pode determinar a capacidade de indução proliferativa ou morte celular (apoptose ou necrose).

Os resultados anteriores indicaram um ligeiro aumento na frequência dos esplenócitos tratados com as suspensões de NTCPMs carboxilados no tempo de 48 horas. Estes resultados podem ser um indicativo de proliferação celular, e por este motivo, foi aplicado o teste de proliferação com MTT. Esta técnica baseia-se na capacidade das células vivas em metabolizar os sais de tetrazólio (MTT), resultando na formação de cristais azuis (formazan), que podem ser solubilizados e quantificados por espectrofotometria. A quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas presentes na cultura (MOSMANN, 1983). Este estudo foi realizado com as mesmas concentrações de NTCPMs carboxilados propostas no teste de viabilidade.

Na Figura 9, é apresentado o resultado da proliferação celular dos esplenócitos tratados com CpG e tratados com as suspensões de NTCPMs carboxilados após 72 horas de incubação. O CpG foi utilizado como controle positivo porque é capaz de ativar *in vitro* a proliferação de células B, células dendríticas, monócitos, macrófagos, bem como aumentar a atividade de células *natural killer* (NK) (KRIEG, 2002).

De acordo com a Figura 9, é possível verificar que a proliferação dos grupos de esplenócitos tratados com as suspensões de NTCPMs carboxilados apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada à proliferação dos esplenócitos tratados com CpG. O controle estimulado com CpG mostra que os esplenócitos podem ser ativados. Quanto aos esplenócitos tratados com 1, 5 e 10 ng/mL de NTCPMs carboxilados, não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre esses grupos de células.

Como não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem a proliferação de esplenócitos com NTCPMs funcionalizados, nossos resultados iniciais sugerem que estas estruturas não induzem a proliferação de esplenócitos *in vitro*.

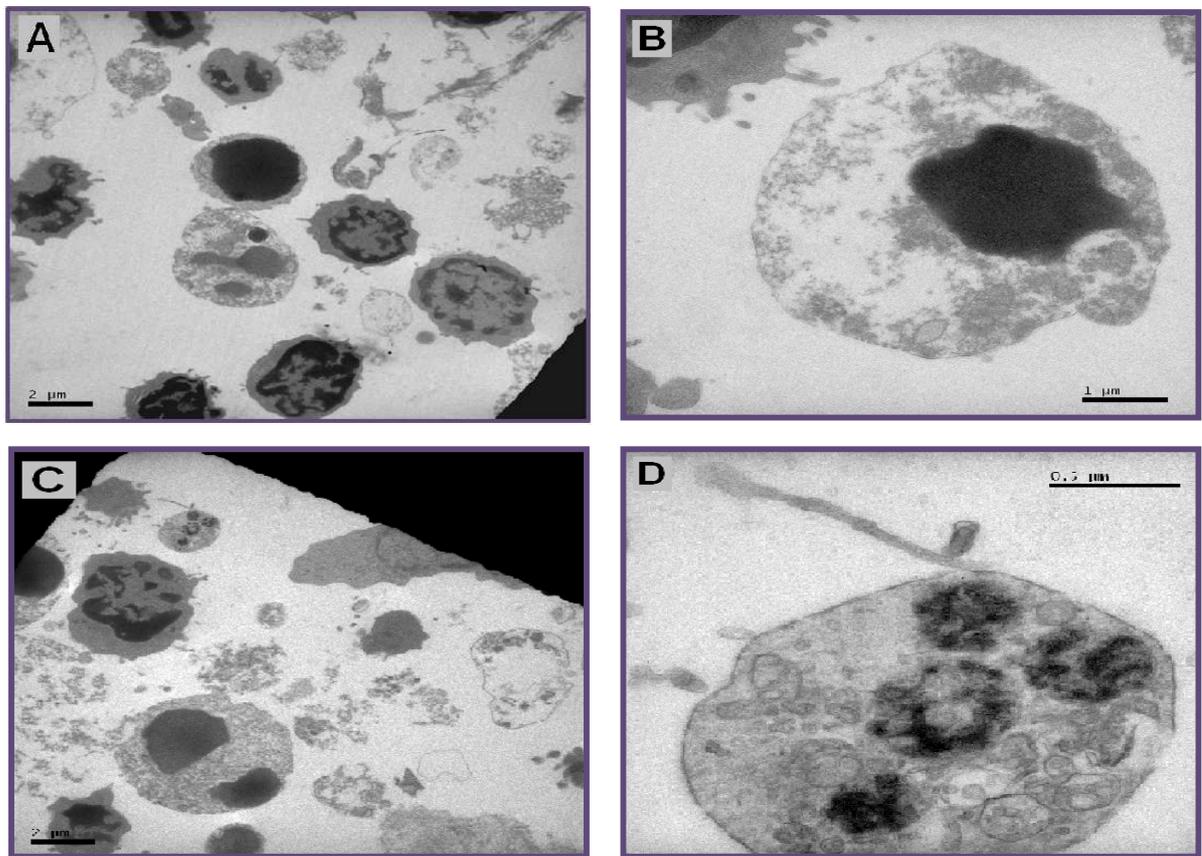


**Figura 9:** Proliferação celular de esplenócitos tratados com CpG e tratados com NTCPMs carboxilados após 72 horas de cultivo celular. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos tratados com NTCPMs carboxilados.

#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 10 apresenta imagens de MET após 48 horas de incubação dos esplenócitos não tratados (A e B) e esplenócitos tratados com 10 ng/mL de NTCPMs carboxilados (C e D). De acordo com a análise microscópica das amostras, não foi possível visualizar algum tipo de interação entre NTCPMs carboxilados e os esplenócitos. Ao mesmo tempo também não foram observados sinais de dano celular, como formação de corpos apoptóticos, ruptura de membrana e fragmentação nuclear (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005).

Dois fatores provavelmente contribuem para a impossibilidade de visualização do nanotubos de carbono; o primeiro é relacionado ao tratamento das células, pois elas são cultivadas em meio de cultura rico em soro fetal bovino, e segundo um estudo prévio, a presença desse suplemento no meio reduz a internalização celular dos nanotubos (ZHU, 2009). Entretanto, nas imagens de MET mostradas no artigo não é evidente a presença dos nanotubos. Outro fator é a semelhança da coloração celular apresentada no MET com a coloração natural dos nanotubos.



**Figura 10:** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de esplenócitos em diferentes escalas. (A e B) controle, (C e D) esplenócitos tratados com 10 ng/mL NTCPMs carboxilados.

#### 4.5 Citometria de Fluxo

Experimentos de viabilidade e proliferação celular determinam números totais de células, entretanto eles não podem ser utilizados para análise de populações celulares específicas. Mesmo que não tenha sido observado nenhuma alteração significativa no número total de células, é possível que os nanotubos de carbono atinjam populações específicas de células, principalmente linfócitos T e linfócitos B, alterando a relação entre esses número de células.

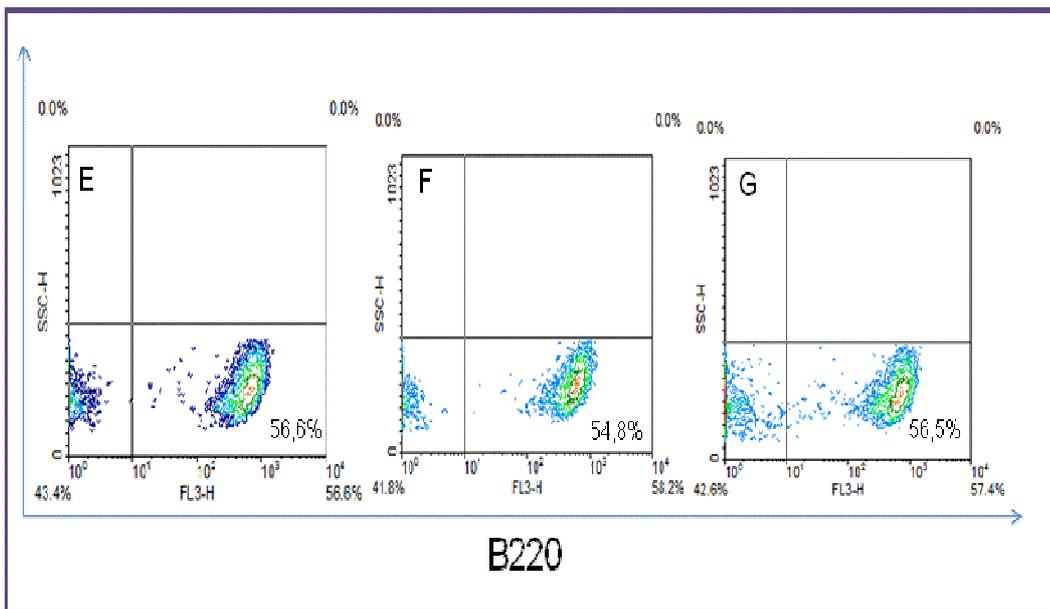
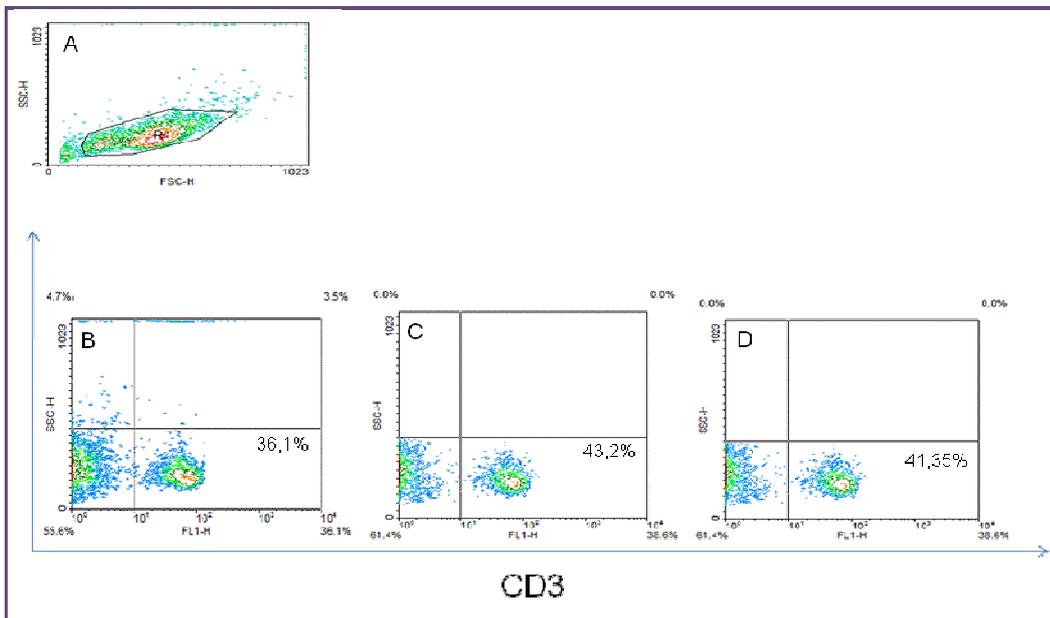
Afim de determinar se os nanotubos de carbonos alteram quantidades de células específicas, *in vivo*, grupos de camundongos foram tratados pela via intravenosa com 50 ou 100 μg dos NTCPMs carboxilados e 48 horas após, os esplenócitos foram

isolados e os baços marcados com anticorpos anti-CD3 conjugado a FITC e anti-B220 conjugado a Cycon e analisados por citometria de fluxo.

Na Figura 11, são apresentados os resultados da citometria dos esplenócitos dos camundongos tratados. Inicialmente foi caracterizada a população de linfócitos, considerando os parâmetros granulocidade (FSC) e tamanho (SSC) (Figura 11A) e dentro dessa população os linfócitos T. Os linfócitos T foram identificados a partir do marcador de superfície CD3, sendo que as amostras controle apresentam uma porcentagem de 36,1% de linfócitos T, dentro da população total de linfócitos (Figura 11B).

Porcentagens semelhantes de linfócitos T, já foram observadas anteriormente (AVULA, 2001). Quanto as células dos animais tratados, não foi observado um aumento significativo no número de linfócitos T para a dose de 50 µg (43,2%) e para a dose de 100 µg (41,35%) (Figuras 11C e D). Estudos sobre a ação de nanotubos de carbono sobre linfócitos T já foram conduzidos anteriormente, eles sugerem que essas partículas causam diminuição da capacidade proliferativa e diminuição da proliferação a um mitógeno (MITCHELL *et al.*, 2007), entretanto a forma de administração foi inalatória, e sabe-se que diferentes vias de administração promovem respostas imunes diferentes (CLARK *et al.*, 2010).

Park e colaboradores (2009) demonstraram que nanotubos de carbono de parede múltipla administrados através da via intratecal promovem um aumento da distribuição de células B nos órgãos linfóides assim como de imunoglobulina E (IgE) sérica. Dessa forma, é provável que os nanotubos utilizados nesse estudo alterem quantitativamente os linfócitos B esplênicos, principalmente se estiverem contaminados com LPS. Para a identificação das células B foi utilizado o marcador de superfície celular B220. A figura 11E mostra a porcentagem de linfócitos B presentes no baço de camundongos não tratados (56,6%). Da mesma forma que os linfócitos T, não foram observadas alterações significativas entre esse grupo controle e os tratados com 50 µg (54,8%) ou 100 µg (56,5%) como apresentado nas Figuras 11F e 11G, respectivamente.



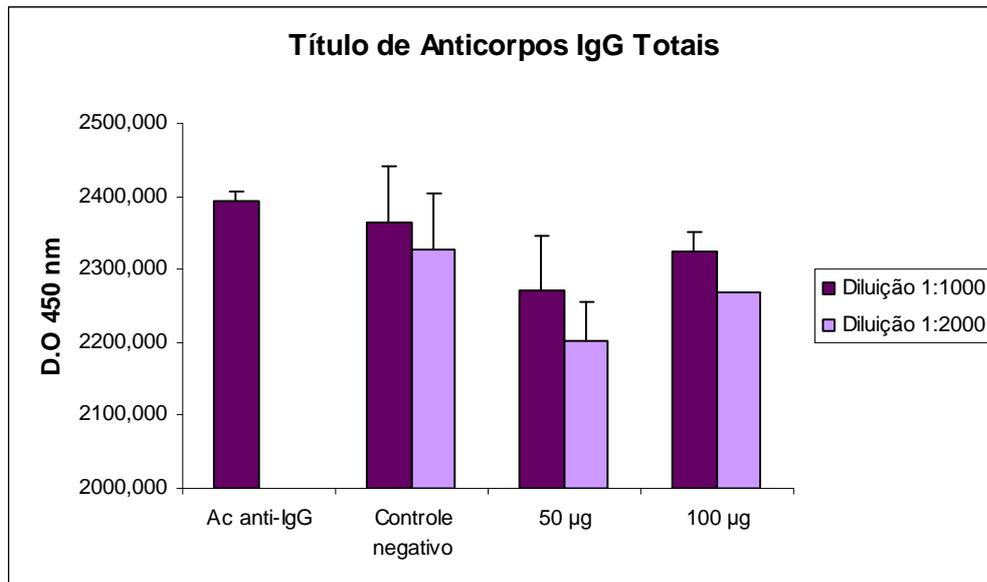
**Figura 11:** Análise de linfócitos T e células B após administração *in vivo* dos NTCPMs carboxilados. (A) Gate de linfócitos, (B) CD3<sup>+</sup> controle, (C) CD3<sup>+</sup> 50 µg (D) CD3<sup>+</sup> 100 µg, (E) B220<sup>+</sup> controle, (F) B220<sup>+</sup> 50 µg e (G) B220<sup>+</sup> 100 µg.

#### 4.6 Determinação de Anticorpos IgG Totais

Nesse experimento, foram avaliados os níveis de anticorpos IgG totais no soro de camundongos não tratados e tratados com NTCPMs carboxilados através da técnica de enzimaímunensaio (ELISA). Em geral, imunoenaios podem ser definidos como métodos analíticos usados para a identificação ou quantificação de antígenos ou anticorpos presentes numa amostra (EKINS, 1998). As técnicas de imunensaio são rápidas, de fácil execução, reprodutíveis e não requerem equipamentos sofisticados (MIRE-SLUIS; DAS; PADILLA, 1998). Apesar do grande número de testes disponíveis, o ELISA continua sendo o mais utilizado nos laboratórios por apresentar alta sensibilidade e especificidade (VIGNALI, 2000).

A Figura 12, mostra os níveis de anticorpos IgG totais detectados no soro de camundongos não tratados e tratados com 50 e 100 µg de NTCPMs carboxilados. Ao analisar a Figura 12, percebe-se que os dois grupos tratados com NTCPMs carboxilados, apresentam níveis de anticorpos IgG totais similares aos observados no grupo não tratado. Este resultado sugere que a amostra de NTCPMs carboxilados, não induz a estimulação policlonal de células B, mesmo se houver a presença de LPS contaminante. É importante salientar que o LPS, também conhecido como endotoxina, é capaz de promover a estimulação policlonal de células B, resultando na secreção de anticorpos inespecíficos (MUNOZ, 1964).

Desta forma, a ausência de alterações significativas nos níveis de anticorpos IgG totais nos grupos tratados quando comparados ao grupo não tratado, indica que os NTCPMs carboxilados utilizados neste estudo não apresentam caráter adjuvante. Não foram encontrados estudos na literatura que relacionassem os efeitos de NTCs funcionalizados com níveis de anticorpos IgG total no soro de camundongos.



**Figura 12:** Produção de anticorpos IgG totais no soro de camundongos tratados e não tratados após 20 dias da administração via intravenosa de NTCPMs carboxilados.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às suas propriedades diferenciadas, os NTCs estão sendo intensamente estudados para o desenvolvimento de adjuvantes para vacinas, distribuição de fármacos e biosensores. Porém, existem poucas informações sobre a interação destas estruturas com as células do sistema imunológico. Desta forma, este trabalho objetivou investigar a influência dos NTCPMs carboxilados sobre células do sistema imunológico *in vitro* e *in vivo*.

Primeiramente, foi realizado o teste de viabilidade celular que teve como finalidade avaliar um possível efeito tóxico dos NTCPMs carboxilados sobre esplenócitos e células da medula óssea. Ao entrarem em contato com as suspensões de NTCPMs carboxilados, os esplenócitos e as células da medula óssea poderiam ou não sofrer alterações na viabilidade. De acordo com os resultados, verificamos que os NTCPMs carboxilados não causaram alterações significativas na frequência destas células. No entanto, observamos um aumento na frequência de esplenócitos viáveis diretamente proporcional às concentrações das suspensões de NTCPMs carboxilados no tempo de 48 horas, e por este motivo, decidimos realizar o teste de proliferação celular. Neste teste, observamos que os NTCPMs carboxilados não induziram a proliferação de esplenócitos.

Como os testes de viabilidade e proliferação celular determinam o número total de células, foi realizada a citometria de fluxo para analisar uma possível alteração nas populações específicas de linfócitos T e linfócitos B. Também, não houve alteração significativa na porcentagem de células CD3<sup>+</sup> (linfócitos T) e B220<sup>+</sup> (linfócitos B).

Através da análise microscópica, podemos verificar se os NTCPMs carboxilados causavam algum tipo de interação com os esplenócitos e/ou dano celular. Após analisar as imagens feitas por MET, não foi observado dano celular e qualquer tipo de interação entre os NTCPMs carboxilados e os esplenócitos.

Por fim, avaliamos os níveis de anticorpos IgG totais no soro de camundongos através da técnica de ELISA, considerando a hipótese de existir LPS contaminante na amostra de NTCPMS carboxilados. Os resultados mostraram que não houve alteração significativa nos níveis de anticorpos IgG totais no soro de camundongos tratados com os NTCPMs carboxilados.

Sendo assim, os resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que os NTCPMs carboxilados utilizados no desenvolvimento deste estudo, não apresentaram efeitos estimulatórios sobre células do sistema imunológico e nas mesmas condições não apresentam toxicidade celular.

Como perspectiva de continuidade deste trabalho, sugere-se que os mesmos estudos devem ser conduzidos com NTCs carboxilados e células T humanas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AVULA, C. P. R. *et al.* Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.2546-2552, 2001.

BALASUBRAMANIAN, K; BURGHARD, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**, v.1, n.2, p.180-192, 2005.

BIANCO, A. *et al.* Biomedical Applications of Functionalised Carbon Nanotubes. **Royal Society of Chemistry**, p. 571-577, Reino Unido, 2005.

BRAS, M.; QUEENAN, B; SUSIN, S. A. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying, **Biochemistry**, v.70, n.2, p.231-239, 2005.

BOTTINI, M. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. **Toxicology Letters**, v.160, p. 121-126, 2006.

CAPAZ, R. B.; CHACHAM, H. Nanotubos e a nova era do carbono. **Ciência Hoje**, v.33, n.198, 2003.

CLARK, S. O. *et al.* Oral delivery of BCG Moreau Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination. **Vaccine**, v.28, n.43, p.7109-71-16, 2010.

COUTEAU, E. CVD synthesis of high-purity multiwalled carbon nanotubes using CaCO<sub>3</sub> catalyst support for large-scale production. **Chemical Physics Letters**, v.378, p.9-17, 2003.

DAI, L.; MAU, A. W. H. Controlled Synthesis and Modification of Carbon Nanotubes and C60: Carbon Nanostructures for Advanced Polymeric Composite Materials. **Advanced Materials**, v.13, n.12-13, p. 899-913, 2001.

DONALDSON, K. *et al.* Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. **Toxicological Sciences**, v.92, n.1, p.12, Edinburgh, 2006.

DOWLING, A. P. Development of nanotechnologies. **Materialstoday**, v.7, n.12, p.30-35, 2004.

DRESSELHAUS, M. S. *et al.* **Science of fullerenes and carbon nanotubes**. New York Academic Press, 1996.

DRESSELHAUS, M. S. *et al.* **Graphite fibers and filaments**. Ed. Springer-Verlag, 1998.

DUMORTIER, H. *et al.* Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. **Nano Letters**, v.6, n.7, p.1522-1528, 2006.

EKINS, R. P. Ligand Assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. **Clinical Chemistry**, v.44, n.9, p.2015-2030, 1998.

FIORITO, S. *et al.* Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, p.591-599, 2006.

FIRME, C.P; BANDARU, P.R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, p.1-10, 2009.

FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. drug delivery and biocompatibility issues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.4, p.183-200, 2008.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v.28, p.109-123, 2004.

GRABINSKI, C. *et al.* Effect of Particle Dimension on Biocompatibility of Carbon Nanomaterials. **Carbon**, v.45, n.14, p.2828-2835, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. England: Oxford University Press, 1998/1999.

HALLOCK, M. F. *et al.* Potential Risks of Nanomaterials and How to Safely Handle Materials of Uncertain Toxicity. **Journal of Chemical Health & Safety**, v.16, p.16-23, 2009.

HALLOCK, M. F. *et al.* Potential Risks of Nanomaterials and How to Safely Handle Materials of Uncertain Toxicity. **Journal of Chemical Health & Safety**, v.16, p.16-23, 2009.

HERBST, M. H; MACÊDO, M. I. F; ROCCO, A. M. Tecnologia dos Nanotubos de Carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v.27, n.6, p.986-987, Rio de Janeiro, 2004.

HILDING, J. *et al.* Dispersion of carbon nanotubes in liquids. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.24, n.1, p.1-41, 2003.

JANEWAY, C.A *et al.* **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6.ed.

**Artmed Editora**, 2006.

JIA, G. *et al.* Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environmental Science & Technology**, v.39, p.1378-1383, 2005.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v.11, p.77-89, 2009.

JONES, C.; GRAINGER, D. W. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.438-456, 2009.

KLUMPP, C. *et al.* Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, n.3, p.404-412, 2006.

KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.709-760, 2002.

KARTHIKEYAN, S.; MAHALINGAM, P.; KARTHIK, M. Large scale synthesis of carbon nanotubes. **E-Journal of Chemistry**, v.6, n.1, p.1-12, 2009.

LACERDA, L. *et al.* Carbon Nanotubes as Nanomedicines: from toxicology to pharmacology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.14, p.1462-1463, Londres, 2006.

MAGREZ, A. *et al.* Cellular toxicity of carbon-based Nanomaterials. **Nano Letters**, v.6, n.6, p.1121-1125, 2006.

MENG, L.; FU, C.; LU, Q. Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. **Progress in Natural Science**, v.19, n.7, p.801-810, 2009.

MERKOÇI, A. Carbon nanotubes in analytical sciences. **Microchimica Acta**, v.152, p.157-174, 2006.

MIRE-SLUIJ, A. R.; DAS, R. G.; PADILLA, A. WHO cytokine standardization: facilitating the development of cytokines in research, diagnosis and as therapeutic agents. **Journal of Immunological Methods**, v.216, p.103-116, 1998.

MITCHELL, L. A. Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. **Toxicological Sciences**, v.100, n.1, p.203-214, 2007.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A; INMAN, A. O; ZHANG, L. W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.234, p.222-235, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUNOZ, J. Effect of bacteria and bacterial products on antibody response. **Advanced Immunology**, v.4, p.397-440, 1964.

OBERDÖRSTER, G. *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, v.2, n.8, p.1-35, 2005.

PALOMÄKI, J. *et al.* Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. **Toxicology**, v.267, p.125-131, 2010.

PANTAROTTO, D. *et al.* Immunization with Peptide-Functionalized Carbon Nanotubes Enhances Virus-Specific Neutralizing Antibody Responses. **Chemistry & Biology**, v. 10, p.961–966, 2003a.

PANTAROTTO, D. *et al.* Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.6160-6164, 2003b.

PARK, E-J. *et al.* Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. **Toxicology**, v.259, n.3, p.113-121, 2009.

PIRET, J-P. *et al.* Dispersion of multi-walled carbon nanotubes in biocompatible dispersants. **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, p.75-82, 2010.

ROMERO, J. G. V. *et al.* Síntese de Nanotubos de Carbono de Parede Simples por Sublimação de Grafite em Atmosfera de Hélio. **Química Nova**, v.25, n.1, p.59, São Paulo, 2002.

SALVADOR-MORALES, C. *et al.* Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. **Molecular Immunology**, v.43, p.193-201, 2006.

SINGH, R. *et al.* Tissue Biodistribution and Blood Clearance Rates of Intravenously Administered Carbon Nanotube Radiotracers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.9, p.3357-3362, 2006.

SMART, S. K. *et al.* The Biocompatibility of Carbon Nanotubes. **Carbon**, v. 44, n.6, p.1034-1047, 2005.

SOUZA, A. G. F.; FAGAN, S. B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v.30, n., p.1695-1703, 2007.

STERN, S. T.; McNEIL, S. E. Nanotechnology Safety Concerns Revisited. **Toxicological Sciences**, v.101, n.1, p.8-9, Maryland, 2007.

SUN, Y. *et al.* Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v.35, n.12, p.1096-1104, 2002.

TASIS, D. *et al.* Soluble Carbon Nanotubes. **Chemistry - A European Journal**, v.9, n.17, p.4000-4008, 2003.

THOMAS, T. *et al.* Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v.1, p.426-433, 2009.

THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T-W. Advances in the Science and Technology of Carbon Nanotubes and their Composites: a Review. **Composites Science and Technology**, v.61, p.1899-1912, 2001.

VIGNALI, D. A. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of Immunological Methods**, v.243, p.243-255, 2000.

WANG, Y.Y; F, R. A. How Diverse: CD4 Effector T Cells and their Functions. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.1, p.20-36, 2009.

YANG, S. *et al.* Biodistribution of Pristine Single-Walled Carbon Nanotubes *In Vivo*. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.111, n.48, p. 17761-17764, 2007.

YANG, S. *et al.* Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. **Toxicology Letters**, v.181, p. 182-189, 2008.

YU, Y. *et al.* Exploring the Immunotoxicity of Carbon Nanotubes. **Nanoescala Research Letters**, China, n. 3, p. 274, 2008.

ZARBIN, A. J. G. Química de (Nano) Materiais. **Química Nova**, v.30, n.6, p.1469-1479, 2007.

ZEINALI, M. *et al.* Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes. **Immunology Letters**, v.126, p.48-53, 2009.

ZHANG, Y.; BAI, Y.; YAN, B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. **Drug Discovery Today**, v.00, n.00, p.1-8, 2010.

ZHANG, Y-B. *et al.* Functionalized carbon nanotubes for detecting viral proteins. **Nano Letters**, v.7, n.10, p.3086-3091, 2007.

ZHU, Y. Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. **Carbon**, v.47, p.1351-1358, 2009.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)