

Braulio Henrique Freire Lima

Efeitos da administração pulmonar de nanotubos de carbono em camundongos

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2012



Braulio Henrique Freire Lima

3

6 Efeitos da administração pulmonar de nanotubos de carbono em camundongos

9

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

12

15

18

Orientação: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira  
Co-orientação: Prof. Dr. Remo de Castro Russo

21

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2012

24

27

30

33

36

39

42

**“Never say never, because limits like fears  
are often just an illusion”**

45

Michael Jordan

## Agradecimentos

48 Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores Mauro e  
Remo, por depositarem em mim confiança e credibilidade, além de me darem todo o  
suporte e apoio para que este trabalho fosse realizado nas melhores condições e com  
51 a menor carência possível, seja de incentivo, materiais, discussões....

Gostaria também de agradecer à minha família, principalmente meus pais,  
pelo apoio, compreensão e incentivo durante todo este percurso, ainda mais no final  
54 desta caminhada que não é um período fácil e é quando você às vezes cogita se seria  
capaz de realiza-lo.

Agradeço também aos meus amigos, tanto de colégio quanto de faculdade  
57 por oferecerem sempre uma boa companhia, bons papos e principalmente um ótimo  
refúgio quando queremos apenas esquecer que cursamos uma pós graduação e  
temos pilhas de tarefas para fazer mas, que naquele momento, só queremos ficar à  
60 toa e esquecer da vida, seja onde for.

Aos outros orientadores do lab, Antônio, Dani, Vanessa, Fabiana, Lucíola  
e Gustavo pela também confiança, conversas informais, discussões científicas que  
63 nos sempre enriquecem. Gostaria também de agradecer especialmente a Milene,  
quem me ajudou MUITO com a parte de histologia e patologia dos pulmões.

Ao Prof. Ado Jório e à Jaqueline Soares, do Departamento de Física do  
66 ICEX/UFMG, pelas medições na Espectroscopia Raman, e também por permitir o  
conhecimento de um campo totalmente novo no qual eu nunca imaginaria trabalhar.

À Ilma, Frank, Mirla e Sirley que fazem um trabalho excepcional e que sem  
69 elas o laboratório talvez não funcionasse.

À Bárbara que me ajudou bastante durante minha adaptação ao lab.  
Principalmente ao Gabriel, que nesse fim de curso simplesmente me ajudou  
72 BASTANTE e acredito que não teria conseguido sem a ajuda dele.

Ao Elisão, Pedro, Polidoro, Sylvia que me ajudaram bastante com as  
nossas conversas sobre ciência, principalmente no momento mais sagrado, o  
75 cafezinho da bioquímica. Às outras pessoas do lab que sempre me ajudam quando  
preciso que são a Cris, Lu, Lívia, Aninha e cia.

78 A todo o grande Grupo Imunofar, que conta com pessoas excepcionais e  
que sempre deixam o ambiente de trabalho agradável e tranquilo, fazendo daqui um  
ótimo lugar pra se estar e trabalhar.

81 Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e  
Imunologia e seus funcionários, principalmente à Celise, pela oportunidade e boa  
vontade que permitiu a boa execução desse trabalho.

84 À banca examinadora pela disponibilidade em aceitar o convite para  
avaliação desta Dissertação.

Às agencias financiadoras CNPq e CAPES.

87 Muito obrigado a todos!

## Sumário

90		
	<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
	1.1 - A NANOTECNOLOGIA NO MUNDO .....	17
93	1.2 - O ELEMENTO FUNDAMENTAL CARBONO.....	19
	1.3 - NANOTUBOS DE CARBONO .....	22
	1.4 - ASBESTO E A FIBROSE PULMONAR .....	26
96	1.5 - TOXICIDADE E BIOCMPATIBILIDADE DOS NANOTUBOS DE CARBONO .....	32
	<b>2 - JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
	<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
99	3.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	38
	3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
	<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
102	4.1 - DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
	4.1.1 - <i>In vitro</i> .....	39
	4.1.2 - <i>In vivo</i> .....	40
105	4.2 - NANOTUBOS DE CARBONO .....	40
	4.3 - SOLUBILIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO .....	42
	4.4 - MICROSCOPIA RAMAN.....	43
108	4.5 - ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	44
	4.5.1 - <i>Cultivo celular, preparação das placas e estimulação</i> .....	44
	4.5.2 - <i>Quantificação de nitrito pelo Método de Griess</i> .....	46
111	4.5.3 - <i>Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) intracelulares</i> .....	46
	4.5.4 - <i>Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas pelo método do ELISA (Enzime Linked Immunosorbant Assay)</i> .....	47
114	4.6 - ESTUDOS <i>IN VIVO</i> .....	47
	4.6.1 - <i>Animais</i> .....	47
117	4.6.2 - <i>Instilação Intranasal de NTCs e eutanásia</i> .....	48
	4.6.3 - <i>Lavado Bronco-alveolar (BAL) e coleta dos pulmões</i> .....	48
	4.6.4 - <i>Contagem total e diferencial das células do BAL</i> .....	49
120	4.6.5 - <i>Processamento tecidual para dosagem de citocinas/quimiocinas, NAG e MPO</i> .....	49
	4.6.6 - <i>Dosagem da atividade de NAG tecidual</i> .....	50

123	4.6.7 - <i>Dosagem da atividade de MPO tecidual</i> .....	50
	4.6.8 - <i>Ensaio para quantificação de Hidroxiprolina (OH-prolina) tecidual</i> .....	51
	4.7 - HISTOPATOLOGIA.....	52
126	4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
	<b>5 - RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
	5.1 - 1ª PARTE – RESULTADOS <i>IN VITRO</i> .....	54
129	5.1.1 - <i>Nanotubos de carbono induzem a produção de NO em células RAW 264.7 de maneira variada in vitro</i> .....	54
	5.1.2 - <i>Nanotubos de carbono induzem as células RAW 264.7 a produzir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO imediatamente após o estímulo in vitro</i> .....	56
132	5.1.3 - <i>Nanotubos de carbono são capazes de induzir a produção de IL-1 <math>\beta</math> mas não de TNF <math>\alpha</math> em células THP-1 in vitro</i> .....	60
135	5.1.4 - <i>O nanotubo de carbono 1100 induz a produção de IL-8 por células A549 (epitélio alveolar pulmonar imortalizada) in vitro, mas não o 3150</i> .....	62
	5.2 - 2ª PARTE – RESULTADOS <i>IN VIVO</i> COM PBS.....	64
138	5.2.1 - <i>Resultados do composto 1100 (SWNT 70%C)</i> .....	64
	5.2.2 - <i>Resultados do composto 3150 (MWNT 95%C)</i> .....	71
	5.3 - 3ª PARTE – RESULTADOS <i>IN VIVO</i> COM SFB.....	78
141	5.3.1 - <i>Resultados do composto 1100</i> .....	78
	5.3.2 - <i>Resultados do composto 3150</i> .....	87
	5.3.3 - <i>Avaliação citológica e histopatológica</i> .....	95
144	5.4 - SUMÁRIO DOS RESULTADOS .....	103
	<b>6 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>104</b>
	<b>7 - CONCLUSÃO</b> .....	<b>115</b>
147	7.1 - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO COMPOSTO 1100.....	116
	7.2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COMPOSTO 1100.....	117
	7.3 - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO COMPOSTO 3150.....	118
150	7.4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COMPOSTO 3150.....	119
	7.5 - APROVAÇÃO CONCEDIDA PELO CTEA.....	120
	<b>8 - BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>121</b>
153		

### Lista de Abreviações

156

ANOVA – *Analysis of variance* (Análise de variância)

APD – *Avalanche photodiode detector* (Detector Fotodiodo Avalanche)

159 

ATCC – *American Type Cell Culture*

BAL – *Bronchoalveolar lavage* (lavado broncoalveolar)

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina bovina sérica)

162 

CCD – *Charge coupled device* (Dispositivo Integrado Carregado)

CCL2 – *Chemokine (C-C motif) ligand 2*

CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

165 

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CNT – Nanotubos de carbono

DAF – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína

168 

DCFDA - 2',7'-diclorofluoresceína

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

171 

dpi – Dia(s) pós instilação intranasal

DWNT – *Double Wall Carbon Nanotube* (Nanotubo de carbono de parede dupla)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

174 

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

177 

IRAK-M (3) – *Interleucine-1 associated kinase* (Cinase associada ao receptor de IL-1)

LDH – Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolisacarídeo

180 

MEC – Matriz extra celular

MPO – Mieloperoxidase

MSU – Urato monosódico

183 

MWTN – *Multi Wall Carbon Nanotube* (Nanotubo de carbono de parede múltipla)



- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Monoidrogenofosfato de sódio
- NaCl – Cloreto de Sódio
- 186 NAG – N-acetil-glicosaminida
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- NETs – *Neutrophil extracellular traps*
- 189 NO – *Nitric oxide* (Óxido Nítrico)
- NTC – Nanotubo de carbono
- OPD – o-fenilenodiamina dicloridrato
- 192 PAI-1 – *Plasminogen activator inhibitor 1* (Inibidor 1 de ativação do plasminogênio)
- PBS – *Phosphate saline buffer* (Tampão salina fosfato)
- pH – Potencial hidrogeniônico
- 195 PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- sDWNT – Nanotubo de carbono de parede dupla curto (short Double Wall Carbon Nanotube)
- 198 SFB – Soro fetal bovino
- stMWNT – *thin Multi Wall Carbon Nanotube* (Nanotubo de carbono de parede múltipla curto e fino)
- 201 SWNT – *Single Wall Carbon Nanotube* (Nanotubo de carbono de parede única)
- TGF-β1 – *Transforming growth factor beta 1* (Fator de crescimento transformante beta)
- TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
- 204 tMWNT – *thin Multi Wall Carbon Nanotube* (Nanotubo de carbono de parede múltipla fino)
- TNFα – *Tumoral growth factor alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)
- 207

## Lista de Figuras

210	FIGURA 1: TAÇA DE LICURGO .....	17
	FIGURA 2: FATURAMENTO DO MERCADO GLOBAL DA NANOTECNOLOGIA EM 2007 .....	18
	FIGURA 3: CATEGORIAS DE PRODUTOS QUE EMPREGAM A NANOTECNOLOGIA NA SUA MANUFATURA.....	19
213	FIGURA 4: CARBONO E SEUS ALÓTROPOS: DIAMANTE, GRAFITE E FULERENOS .....	20
	FIGURA 5: <i>BUCKMINSTERFULLERENE</i> , OU <i>BUCKYBALL</i> .....	21
	FIGURA 6: O BIOSPHÈRE, MUSEU CANADENSE LOCALIZADO EM MONTREAL .....	22
216	FIGURA 7: MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS PRIMEIROS NANOTUBOS DE CARBONO OBSERVADOS POR IJIMA, 1991.....	23
	FIGURA 8: ESTRUTURAS DO NANOTUBOS DE CARBONO .....	24
219	FIGURA 9: FOLHA DE GRAFENO COM A REPRESENTAÇÃO DOS PARES DE COORDENADAS (N,M) .....	24
	FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS CONFIGURAÇÕES POSSÍVEIS PARA OS NANOTUBOS .....	25
	FIGURA 11: FOTOGRAFIA E FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ESTRUTURA MACRO E MICROSCÓPICA DA ANTOFILITA, UM TIPO DE ASBESTO .....	29
222	FIGURA 12: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE LESÃO/CICATRIZAÇÃO E SUAS ETAPAS PRINCIPAIS .....	30
225	FIGURA 13: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA RESPOSTA IMUNE PULMONAR CONTRA AGENTES PARTICULADOS COMO O ASBESTO POR EXEMPLO .....	31
	FIGURA 14: FOTOMICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COMPARANDO O ASPECTO MORFOLÓGICO DE DOIS NANOTUBOS DE CARBONO DIFERENTES.....	33
228	FIGURA 15: ESQUEMA MOSTRANDO TODOS OS NANOTUBOS DE CARBONO DISPONÍVEIS PARA O TRABALHO... 41	
	FIGURA 16: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MICROSCÓPIO RAMAN CONFOCAL .....	44
231	FIGURA 17: A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO É UMA CARACTERÍSTICA INDIVIDUAL DE CADA NANOTUBO EM CÉLULAS RAW 264.7 .....	55
	FIGURA 18: NTCs INDUZEM A PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO IMEDIATAMENTE APÓS O ESTÍMULO EM CÉLULAS RAW 264.7 .....	57
234	FIGURA 19: NTCs INDUZEM A PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO IMEDIATAMENTE APÓS O ESTÍMULO PORÉM COM MUITO MENOR INTENSIDADE COMPARADO À PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EM CÉLULAS RAW 264.7.....	59
237	FIGURA 20: NTCs INDUZEM A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ MAS NÃO DE TNF $\alpha$ EM CÉLULAS THP-1 COM 24 HS DE ESTIMULAÇÃO .....	61
240	FIGURA 21: NTCs INDUZEM COM INTENSIDADES DIFERENTES A PRODUÇÃO DE IL-8 POR CÉLULAS A549.....	63
	FIGURA 22: RECRUTAMENTO CELULAR CAUSADO PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 É TEMPO DEPENDENTE E OCORRE DE FORMA DIFERENCIADA ENTRE AS VIAS AÉREAS E O PARÊNQUIMA PULMONAR .....	65
243	FIGURA 23: A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO PARÊNQUIMA PULMONAR INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 OCORRE TARDIAMENTE À INSTILAÇÃO DOS NTCs .....	66

246	FIGURA 24: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	68
249	FIGURA 25: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	70
252	FIGURA 26: RECRUTAMENTO CELULAR CAUSADO PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 É TEMPO DEPENDENTE E OCORRE DE FORMA SEMELHANTE ENTRE AS VIAS AÉREAS E O PARÊNQUIMA PULMONAR .....	72
255	FIGURA 27: A INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 NÃO INDUZ A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	73
258	FIGURA 28: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	75
261	FIGURA 29: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	77
264	FIGURA 30: RECRUTAMENTO CELULAR CAUSADO PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB É TEMPO DEPENDENTE E OCORRE DE FORMA SEMELHANTE ENTRE AS VIAS AÉREAS E O PARÊNQUIMA PULMONAR .....	80
267	FIGURA 31: A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB OCORRE JÁ NO 5 <sup>o</sup> DPI .....	81
270	FIGURA 32: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	83
273	FIGURA 33: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB NO PARÊNQUIMA PULMONAR.....	86
276	FIGURA 34: RECRUTAMENTO CELULAR CAUSADO PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 SOLUBILIZADO EM SFB É TEMPO DEPENDENTE E OCORRE DE FORMA SEMELHANTE ENTRE AS VIAS AÉREAS E O PARÊNQUIMA PULMONAR .....	89
279	FIGURA 35: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 3150 SOLUBILIZADO EM SFB NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	91
282	FIGURA 36: PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB NO PARÊNQUIMA PULMONAR.....	93
285	FIGURA 37: A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO COMPOSTO 1100 SOLUBILIZADO EM SFB OCORRE SOMENTE NO 30 <sup>o</sup> DPI.....	94
	FIGURA 38: MICROGRAFIAS DO BAL DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE NTCs ASSOCIADOS AOS LEUCÓCITOS PRESENTES NAS VIAS AÉREAS .....	95
	FIGURA 39: ESPECTROSCOPIA RAMAN DOS NANOTUBOS 1100 E 3150 .....	96
	FIGURA 40: FOTOMICROGRAFIA DAS SECÇÕES DO PULMÃO. COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA.....	98
	FIGURA 41: FOTOMICROGRAFIAS DAS SECÇÕES DO PULMÃO, REGIÃO SUBPLEURAL. COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA .....	99
	FIGURA 42: FOTOMICROGRAFIAS DE SECÇÕES DO PULMÃO. COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE GOMORI .....	100
	FIGURA 43: ESCORE HISTOPATOLÓGICO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR CAUSADA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DE NTC.....	102

## Resumo

288 Nanotubos de carbono (NTC) são alótropos do carbono que pertencem à  
família dos fulerenos. Desde sua descoberta nos anos 70, muitas aplicações para o  
seu uso surgiram em vários campos da ciência, incluindo a biologia/medicina foram  
291 propostas fazendo com que sua produção aumentasse notavelmente. Devido à sua  
semelhança à fibra do asbesto, muitas questões sobre sua segurança foram  
levantadas, porém, pouca informação sobre sua toxicidade está disponível. Por isto,  
294 o objetivo deste trabalho é estudar o possível efeito tóxico que os NTCs podem ter no  
pulmão e investigar se experimentos *in vitro* podem prever a toxicidade *in vivo*. Para  
os experimentos *in vitro*, linhagens de células que estão presentes nos pulmões foram  
297 estimuladas com NTCs de parede única (SWNT) com pureza 70%C e NTCs com  
paredes múltiplas (MWNT) com pureza 95%C em três concentrações diferentes (1,  
10 e 100 µg/mL) ou com controles (negativo, LPS ou MSU) durante 24 h. Nossos  
300 resultados mostraram que os NTCs induziram a produção de ROS e RNS em células  
RAW 264.7 medidos pela reação de Griess e redução DCFDA e DAF. O método do  
ELISA mostrou também que estes nanomateriais foram capazes de induzir a produção  
303 de IL-1β, mas não TNFα, por células THP-1, bem como IL-8 por células A549. Para  
os experimentos *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram instilados por via intranasal  
com 50 µg/animal de cada composto para avaliar a lesão pulmonar. Estes  
306 experimentos indicaram que após apenas uma única instilação, os NTCs podem  
persistir no pulmão por até 30 dias. Contagens do BAL mostraram que eles foram  
capazes de induzir inflamação das vias aéreas no primeiro dia após a instilação, que  
309 foi composta por uma mistura de neutrófilos e células mononucleares, e que este  
influxo celular pára no quinto dia pós instilação. Ao mesmo tempo, o SWNT foi capaz  
induzir a acumulação de neutrófilos no parênquima pulmonar ao longo do tempo  
312 enquanto que o MWNT não o faz. Ensaios de ELISA também revelaram que o SWNT  
pôde induzir, de forma aguda, a produção de citocinas no parênquima pulmonar  
incluindo TNFα, IL-1β, IL-6 e TGF-β1 e CCL2 e também a deposição de colágeno,  
315 medido pelo ensaio de OH-prolina. A solubilização dos NTCs com SFB melhorou a  
aparência macroscópica e a estabilidade das soluções e também induziu inflamação  
seguida por fibrose com uma quantidade elevada de produção de citocinas para  
318 ambos os compostos. Estes resultados indicam que os NTCs são capazes de interagir  
com as células nos pulmões de murinos, causar inflamação e, em seguida, fibrose.

321 Nossos resultados mostraram também que utilizar apenas experimentos *in vitro* para  
predizer a toxicidade dos nanotubos de carbono não é uma maneira eficaz. Ao todo,  
os resultados indicam que os NTCs são um risco biológico em potencial,  
especialmente para aqueles que estão diretamente expostos a eles.

324

Palavras-chave: Nanotubos de carbono, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar

327

**Abstract**

Carbon nanotubes (CNT) are carbon allotropes that belong to the fullerene family. Since their discovery in the 90s, applications for their usage in various fields including biology/medicine were proposed and their production notably increased. Due to their asbestos-like aspect, many questions about their safety have been raised but little information about their toxicity is available. So, the aim of this work is to study the possible toxic effects of carbon nanotubes in the lungs and to assess whether *in vitro* experiments can predict *in vivo* toxicity. For *in vitro* experiments, cell lineages that are present in the lungs were stimulated with single walled CNT (SWNT) 70% purity and multi walled CNT (MWNT) 95% purity in three different concentrations (1, 10 and 100 µg/mL) or with controls (negative, LPS or MSU) for 24hs. Our results showed that CNs induced production of ROS and RNS in RAW 264.7 cells measured by Griess reaction and DCFDA and DAF reduction. ELISA assay also showed that these nanomaterials could induce IL-1 $\beta$  but not TNF $\alpha$  release by THP-1 cells as well as IL-8 by A549 cells. For *in vivo* experiments, C57BL/6 mice were instilled intranasally with 50 µg of each compound to assess lung injury. These experiments also indicated that after only one instillation CNTs could persist in the lung for long periods, up to 30 days. BAL counts revealed that they could induce airway inflammation by the first day after instillation that was composed by a mixture of neutrophils and mononuclear cells and that this cell influx is stopped by the fifth day post instillation. At the same time, the SWNT induce neutrophil accumulation in the parenchyma meanwhile MWNT does not. ELISA assay revealed that SWNT could induce acute cytokine production in the lung parenchyma including TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF-  $\beta$ 1 and CCL2 and also collagen deposition, as measured by OH-proline assay. Solubilization of the CNTs with FBS improved macroscopic appearance and stability of the solutions and induced inflammation followed by fibrosis with high amount of cytokine production for both compounds. However, data is not reliable because FBS itself is able to induce persistent inflammation and cytokine production in the lungs. These results indicate that CNTs are able to interact with cells in the lungs of mice and cause inflammation and then fibrosis. Moreover, *in vitro* experiments do not seem to be reliable to predict lung toxicity and current effort is to standardize these *in vitro* experiments. Altogether, these results indicate that CNTs are a potential inhaled biohazard for those who are directly exposed to them.

360

Keywords: Carbon nanotubes, pulmonary inflammation, pulmonary fibrosis

## 363 1 - Introdução

366 O termo nanotecnologia surgiu em meados dos anos 70 com a adição do  
sufixo “nano” (que em grego quer dizer “anão”) à já existente palavra tecnologia com  
o objetivo de descrever técnicas que lidavam com uma classe de materiais  
extremamente recentes à época, os nanomateriais. Estes compostos possuem uma  
escala extremamente reduzida e, para serem considerados nanomateriais, pelo  
369 menos uma das suas dimensões não pode exceder 100 nm, ou seja 0,0000001 m.

Atualmente, a nanotecnologia (ou nanociência) não lida somente com a  
manipulação de nanomateriais, mas também visa a descoberta, o aprimoramento e a  
372 sua aplicação ao nosso cotidiano seja com novos produtos ou aliando produtos já  
existente a novos nanomateriais, resultando em um produto ainda melhor.

O fascínio da comunidade científica frente aos nanomateriais vem do fato  
375 de que, quando em escalas nanométricas, os materiais passam a apresentar novas  
propriedades e características físicas como resistência, maleabilidade, elasticidade,  
condutividade e poder de combustão quando comparados com seus representantes  
378 em escalas macrométricas. Este efeito é conhecido como efeito quântico e, como  
exemplo, podemos citar o grafite, a prata e o ouro. O grafite é um material maleável,  
mas quando em escala nano, é mais resistente que o aço. O alumínio, que em escala  
381 macro é inerte, na forma nanométrica, entra em combustão espontaneamente. O  
Ouro, em escala nanométrica pode assumir diversas cores (laranja, púrpura, vermelha  
ou até mesmo verde) dependendo do tamanho de sua partícula ([www.abdi.org.br](http://www.abdi.org.br)). O  
384 exemplo mais famoso desse efeito é o da Taça de Licurgo, antiguidade romana do  
século IV d.C. que está exposto no Museu de Londres (Figura 1).





387

**Figura 1: Taça de Licurgo.** O vidro que a compõe possui nanopartículas de ouro que têm o tamanho médio de 20 nm. Dependendo do ângulo que a luz incide sobre a taça, diferentes comprimentos de onda são absorvidos gerando diferentes colorações. (<http://www.britishmuseum.org/>)

390

Apesar de algumas nanoestruturas já serem conhecidas desde a década de 60, somente com a descoberta do fulereno em 1985 (KROTO, HEATH *et al.*, 1985) e outras formas de nanomateriais como os nanotubos de carbono (NTC) em 1993 (BETHUNE, KIANG *et al.*, 1993; IIJIMA e ICHIHASHI, 1993) que a nanotecnologia começou a crescer significativamente (HENNRICH, CHAN *et al.*, 2006).

393

Grande importância tem sido dada aos NTCs pois estes compostos possuem características eletrônicas, estruturais e mecânicas bem peculiares que os tornaram um grande alvo de pesquisas em várias disciplinas como: eletrônica, optoeletrônica, sensores, aparelhos emissores de campo, baterias/células combustíveis, compósitos reforçados, catálise, armazenamento de gases e ultimamente, até na área da Biologia/Medicina (HENNRICH *et al.*, 2006).

396

399

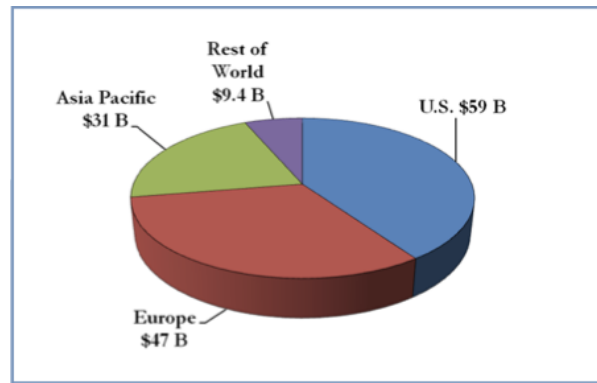
## 402 1.1 - A nanotecnologia no mundo

Com as recentes descobertas e a abertura de um vasto campo para investimentos e descobertas, a nanotecnologia rapidamente virou foco de atenção mundial, gerando um mercado que é um dos mais rentáveis da atualidade.

405

Estima-se que o faturamento global no ano de 2007 foi da ordem de 147 bilhões de dólares (Figura 2) e que a expectativa para o ano de 2015 é que esse número atinja 1 trilhão de dólares.

408

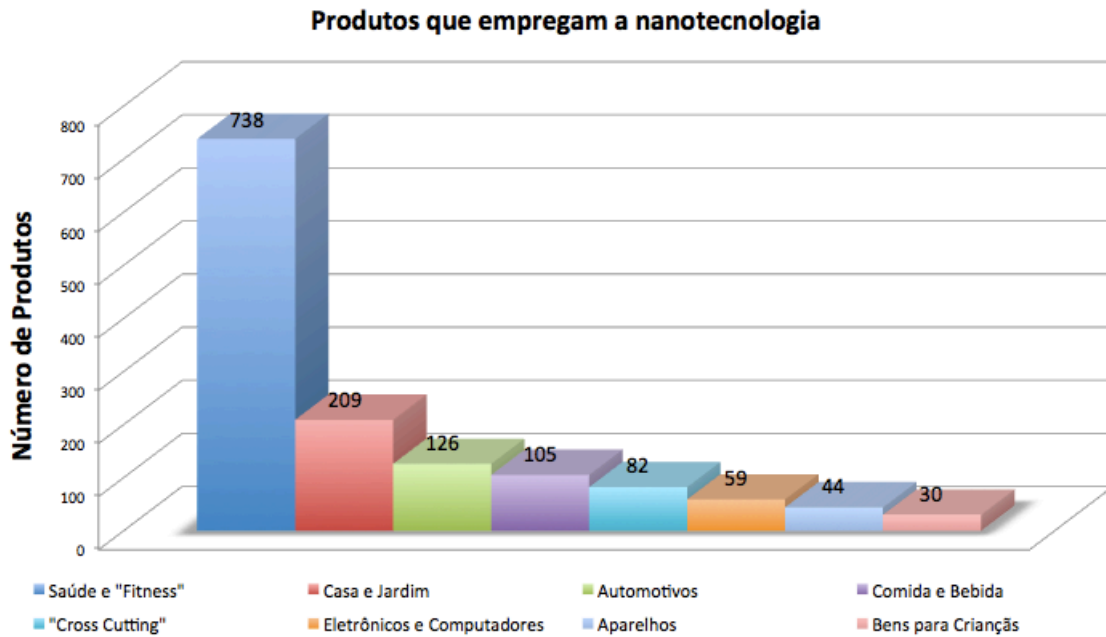


411 **Figura 2: Faturamento do mercado global da nanotecnologia em 2007 (LEAL, WIGHTMAN *et al.*, 2011).**

Esse grande mercado, juntamente com o potencial multi-Industrial passou a atrair o interesse de governos, empresas e pesquisadores, que passaram a investir na área. Segundo o governo dos EUA, no período de 1997 a 2005 foram investidos, globalmente, 18 bilhões de dólares.

417 No ano 2000, nos EUA, lançou o programa *National Nanotechnology Initiative* que proporcionou investimentos de aproximadamente 495 milhões de dólares, que rendeu uma visibilidade extraordinária à área, fazendo com que cada país também criasse sua própria iniciativa relacionada à nanotecnologia e gerando um investimento global de U\$5 bilhões, somente no ano de 2011.

423 Todo este investimento rendeu e vem rendendo vários produtos que já são comercializados ou estão em vias de ser. Para se ter uma idéia, em 2005 eram 54 produtos, em 2009, 1015 e em 2011 o número de produtos foi de aproximadamente 1400 (Figura 3). O mais preocupante é que mesmo sem uma legislação que regulamente a manufatura de produtos que contenham nanopartículas, estes já estão sendo vendidos ou estão em vias de ser em todo o mundo.



**Figura 3: Categorias de produtos que empregam a nanotecnologia na sua manufatura.**

429 (<http://www.nanotechproject.org/>)

Com este gráfico em mente, constata-se que os produtos mais comercializados são aqueles que se enquadram na categoria “Saúde e Fitness” nos  
 432 quais podemos encontrar cosméticos, filtros/filtros solares, material esportivo e de cuidados pessoais. Dentre os nanomateriais empregados destacam-se as nanoemulsões para os cosméticos (*chitosan*), *quantum dots*, filtros solares ( $\text{TiO}_2$ ) e  
 435 nanotubos de carbono nos materiais esportivos.

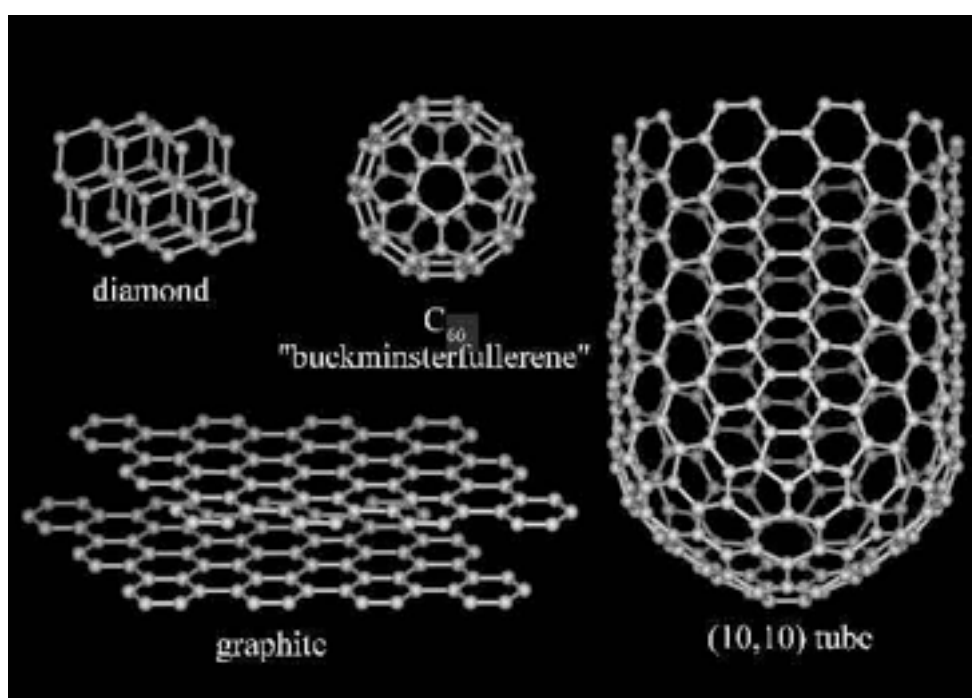
Graças ao seu amplo espectro de aplicações e um futuro bastante promissor, grande atenção tem sido dada aos nanotubos de carbono. Percebe-se isto  
 438 tendo em mente que, no ano de 2012, a produção esperada deste nanocomposto atingirá a marca de 3000 toneladas/ano.

## 1.2 - O elemento fundamental carbono

441 O carbono (do latim *carbo*, carvão) é o elemento mais versátil da tabela periódica. Isso se deve ao número, tipo e estabilidade das ligações que ele pode fazer com os diversos outros tipo de elementos (HENNRICH *et al.*, 2006).

444 Sua versatilidade tem relação direta com sua distribuição eletrônica: o carbono possui 4 elétrons na sua camada de valência ( $1s^2 2s^2 2p^2$ ). Como o orbital 2p cabem até 6 elétrons, o átomo de carbono pode ainda realizar quatro ligações  
 447 covalentes para atingir a estabilidade eletrônica.

Entretanto, dependendo do tipo de ligação feita, os elétrons envolvidos na reação química podem ser tanto do orbital de valência p, quanto do orbital s, ocorre então um fenômeno chamado de hibridização que, simplificada, é a junção do orbital 2s com um ou, dois ou os três orbitais 2p presentes na camada de valência para formar um novo orbital, mais energético que o 2s e menos energético que o 2p. Desta forma, o carbono possui três tipos de hibridização:  $sp$  (orbital 2s mais 1 orbital 2p),  $sp^2$  (orbital 2s mais 2 orbitais 2p) e  $sp^3$  (orbital 2s mais 3 orbitais 2p) (PERUZZO e LEITE DO CANTO, 2006). Devido a este fenômeno, o carbono na fase sólida existe basicamente em três formas distintas: diamante, grafeno e fulerenos (Figura 4) (HENNRICH *et al.*, 2006).



459 **Figura 4: Carbono e seus alótropos: diamante, grafite e fulerenos (HENNRICH *et al.*, 2006).**

O diamante tem uma rede cristalina no qual cada carbono hibridizado na forma  $sp^3$  forma 4 ligações com outros carbonos vizinhos em uma estrutura tetraédrica. Essa rede cristalina garante ao diamante uma estrutura dura (a mais dura conhecida atualmente) e uma ótima condutância térmica. Além disso, devido ao fato de todos os elétrons estarem envolvidos em ligações covalentes, dá ao diamante uma ótima condição de isolante elétrico (HENNRICH *et al.*, 2006).

Outro alótropo do carbono, o grafite, possui características completamente diferentes da do diamante. A partir da sua estrutura, o grafite é composto por uma sucessão de folhas planas de carbonos (grafeno) que se mantêm unidas por forças

de Van der Waals. Estas folhas são compostas por carbonos hibridizados de forma  $sp^2$ , na qual cada carbono se liga a outros 3 carbonos formando uma estrutura hexagonal plana. Como um elétron não participa da hibridização, ele fica livre para compor outro fenômeno físico, a ressonância. Devido à sua estrutura, o grafite é macio, escorregadio e um ótimo condutor de eletricidade (HENNRICH *et al.*, 2006).

Por último temos a família dos fulerenos. Igualmente ao grafite, esta família é constituída por moléculas compostas por carbonos hibridizados na forma  $sp^2$ , entretanto, estas moléculas são esféricas ou tubulares, (HENNRICH *et al.*, 2006) uma vez que seus átomos não estão dispostos de forma plana, 2D. O primeiro componente desta família a ser descoberto foi o fulereno  $C_{60}$ , o *Buckminsterfullerene*, com 60 vértices e 32 faces, nas quais 12 são pentágonos e 20 são hexágonos, como uma bola de futebol, (KROTO *et al.*, 1985) daí também o nome de *Buckyball* (Figura 5)



Figura 5: *Buckminsterfullerene*, ou *Buckyball*. <http://www.nanoprinttech.com/> e <http://www.thenanoage.com/>

Seu nome foi dado em homenagem ao arquiteto Richard Buckminster Fuller, que popularizou a estrutura geodésica (Figura 6) com seus projetos. Como a descoberta da família dos fulerenos veio depois da descoberta desta molécula, adotou-se a simplificação de seu nome, *fullerene*, para representar a família. O sufixo *ene* foi incluído para indicar a presença de pelo menos uma ligação dupla na cadeia carbônica, fato comum na hibridização  $sp^2$ .



492 **Figura 6: O Biosphère, museu canadense localizado em Montreal. O domo geodésico foi**  
495 **inspirado no estilo de R. Fuller.**

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biosph%C3%A8re\\_Montr%C3%A9al\\_CA.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biosph%C3%A8re_Montr%C3%A9al_CA.jpg)

Estes compostos apresentam características como resistência térmica,  
495 mecânica e supercondutividade. Desde sua descoberta, vários novos membros foram  
incluídos na família como por exemplo outros fulerenos ( $C_{20}$ ,  $C_{70}$ ,  $C_{84}$ ,  $C_{540}$ ),  
*nanohorns* (nanotubos em formato cônico) e nanotubos de carbono que serão  
498 discutidos adiante (SCRIVENS, RAWLETT *et al.*, 1997; UO, AKASAKA *et al.*, 2011).

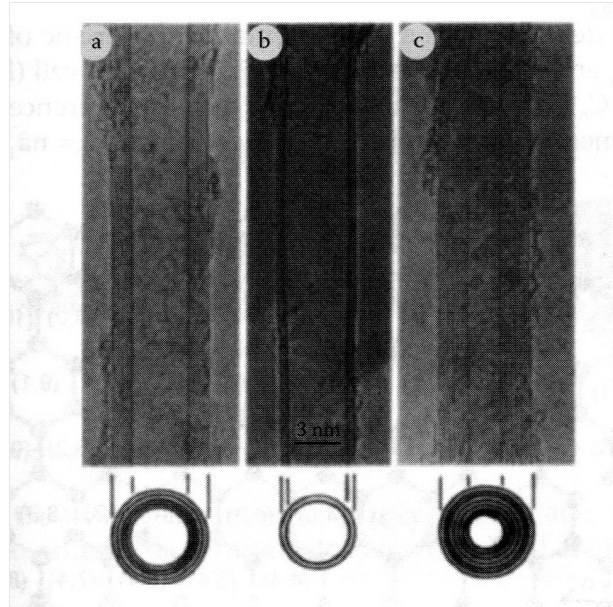
### 1.3 - Nanotubos de carbono

Os primeiros registros de que poderiam existir nano estruturas de carbono  
501 surgiram com as observações de Bacon, em 1956. Enquanto estudava as  
propriedades das fibras de carbono, Bacon propôs a existência de nanoestruturas de  
carbono, que seriam folhas de grafeno enroladas como um tapete (BACON, 1960).  
504 Anos mais tarde, em 1976, Endo enquanto estudava a produção de fibras de carbono  
através da pirólise do benzeno também registrou a existência de tais moléculas  
(OBERLIN, ENDO *et al.*, 1976).

507 A idéia da existência de tais moléculas ganhou muita força quando, em  
1990, Smalley propôs a existência de fulerenos tubulares. Estas moléculas seriam  
produzidas a partir de um fulereno esférico na qual duas extremidades eram  
510 alongadas. Idéia que mais tarde, em 1991, foi apresentada e defendida por  
Dresselhaus em um workshop sobre fulerenos (HENNRICH *et al.*, 2006).

A partir das proposições de Smalley, no mesmo ano de 1991, Iijima obteve  
513 as primeiras provas da existência de nanotubos de carbono de parede múltipla (Figura  
7) (IIJIMA, 1991). A partir daí, foi uma questão de tempo até que, em 1993 e em

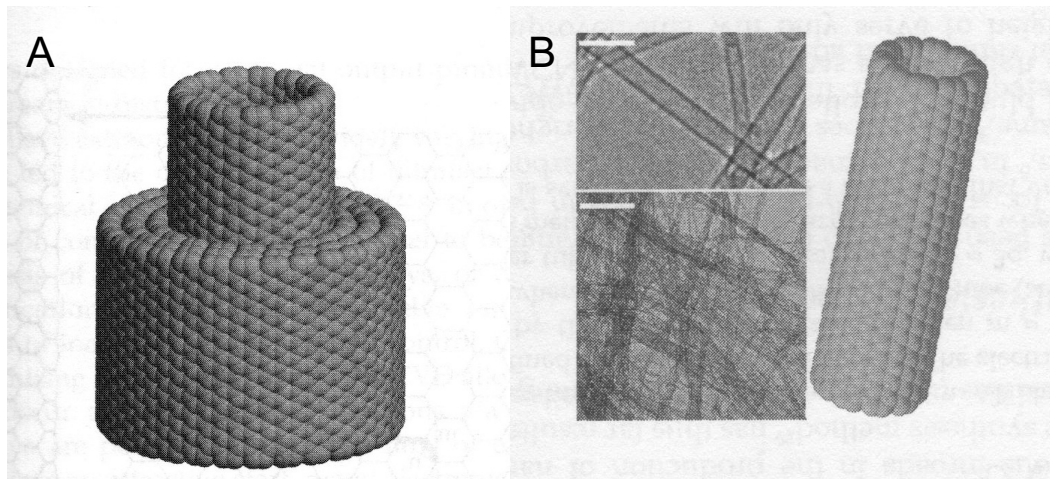
trabalhos independentes, novamente Iijima e também Bethune apresentaram à  
516 comunidade científica uma caracterização e a primeira síntese dos nanotubos de  
carbono de parede simples, na mesma edição da revista Nature (BETHUNE *et al.*,  
1993; IIJIMA e ICHIHASHI, 1993).



519

**Figura 7: Micrografia eletrônica de transmissão dos primeiros nanotubos de carbono observados por Iijima, 1991.** a) MWNT com 5 paredes,  $r=3,35$  nm, b) MWCN com duas paredes,  $r=2,25$  nm e c) MWNT com 7 paredes,  $r=3,25$  nm (com a menor luz  $r=1,1$  nm). Extraído de (HENNRICH *et al.*, 2006).  
522

Diferentemente do modelo proposto por Bacon, os nanotubos de carbono  
525 são folhas de grafeno enroladas, mas que formam um cilindro com seu interior oco  
(IIJIMA e ICHIHASHI, 1993). Existem 2 tipos de nanotubo de carbono: aquele formado  
por uma única folha de grafeno, o nanotubo de parede única (SWNT) e aqueles em  
528 que duas ou mais folhas de grafenos se enrolam concêntricamente, formando vários  
tubos, um dentro do outro. Estes são os nanotubos de parede múltipla (MWNT)  
(Figura 8).



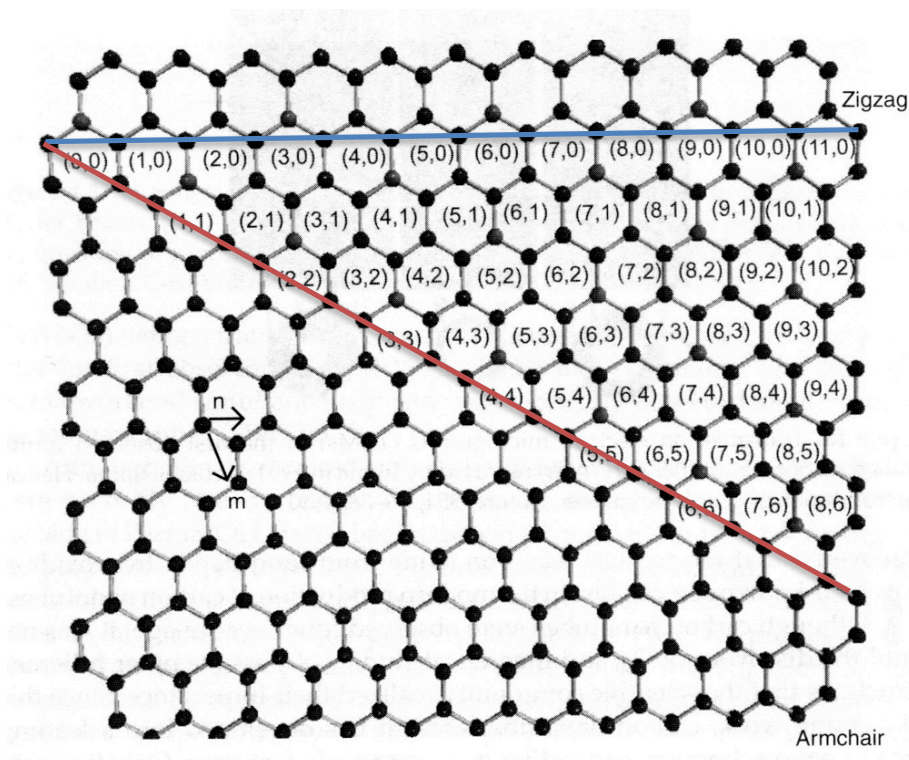
531

**Figura 8: Estruturas do nanotubos de carbono.** a) nanotubo de parede múltipla e b) nanotubo de parede simples. (HENNRICH *et al.*, 2006)

534

Como já discutido anteriormente, os nanotubos são sintetizados a partir do enrolamento de uma folha de grafeno. Entretanto, a orientação em que esta folha é dobrada é de extrema importância, pois isto vai determinar as propriedades fundamentais do tubo como: diâmetro, ângulo quiral e conformação (Figura 9) (HENNRICH *et al.*, 2006).

537

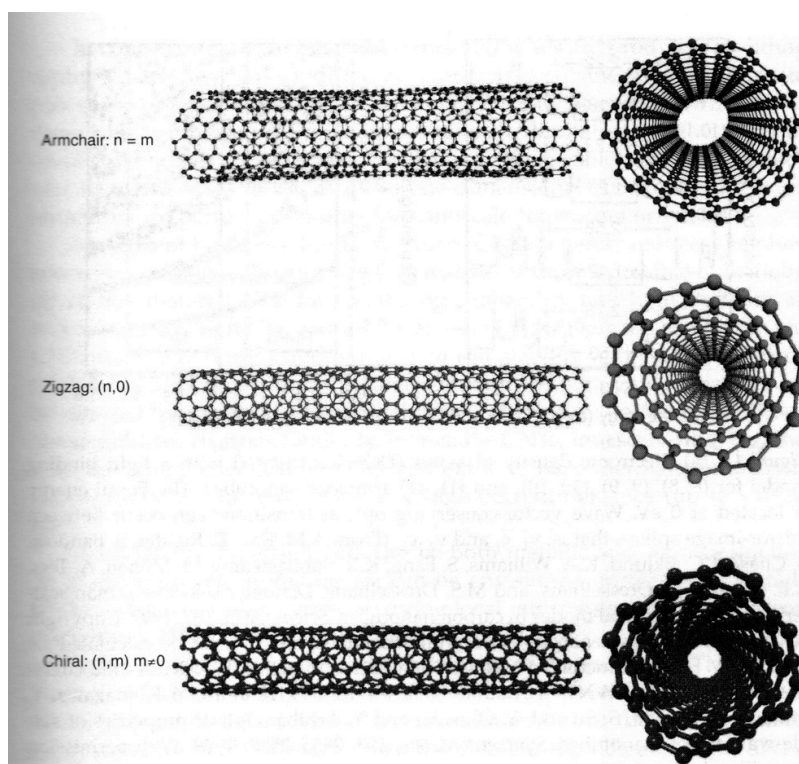


540

**Figura 9: Folha de grafeno com a representação dos pares de coordenadas  $(n,m)$  que determinam o ângulo quiral.** Linha azul liga os dois átomos de carbono que serão unidos para formar o nanotubo do tipo *armchair*. Linha vermelha, para o tipo *zigzag*. Adaptado (HENNRICH *et al.*, 2006).



543 Existem três conformações básicas para os nanotubos: *armchair*, *zigzag* e  
quiral (Figura 10). Os nanotubos *armchair* (n,m) são metálicos, enquanto que os  
*zigzag* (n,0) e quirais (n,m) com  $m \neq 0$  podem ser semimetais ou condutores.  
546 Combinando diferentes diâmetros e a quiralidades, podemos ter várias centenas de  
nanotubos diferentes, cada qual com sua característica mecânica, elétrica,  
piezoelétrica e óticas próprias, o que implica em centenas de aplicações diferentes  
549 para estas moléculas (HENNRICH *et al.*, 2006).



552 **Figura 10: Representação das três configurações possíveis para os nanotubos.** (HENNRICH *et al.*, 2006).

Apesar de cada nanotubo ser único, além da resistência à tensão, peso ultraleve, excelente estabilidade eletrotérmica, podem possuir condutividade elétrica,  
555 além de serem bastante flexíveis (SAITO, DRESSELHAUS *et al.*, 1998; SMART, CASSADY *et al.*, 2005) três outras características são comuns a todos eles: tamanho pequeno, alta proporção comprimento/diâmetro (até 28.000.000/1) (PARK, CHO *et al.*, 2009) e alta superfície de contato (até 1315 m<sup>2</sup>/g) (PEIGNEY, LAURENT *et al.*, 2001).

561 Devido a estas características físicas, várias aplicações vem sendo atribuídas aos nanotubos de carbono nos mais diversos campos. São eles: eletrônica (fios e dispositivos de armazenamento de memória) Jiang *et al.* (2011), optoeletrônica

(LED e lasers), sensores, dispositivos emissores de campo (mostradores e sondas para microscopia) (RIVAS, RUBIANES *et al.*, 2007), baterias e células de combustível, fibras e compostos, catálise, armazenamento de gases (HENNRICH *et al.*, 2006) e na medicina/biologia (remodelagem tecidual, tratamento de cânceres e carreadores de drogas) (KAM, O&APOS;CONNELL *et al.*, 2005; WANG, CHIOU *et al.*, 2010; GAHARWAR, SCHEXNAILDER *et al.*, 2011; ROMAN, NIEDZIELKO *et al.*, 2011).

Apesar de promissoras, as aplicações propostas para as nanopartículas têm recebido da comunidade científica um tratamento bastante cauteloso e crítico em relação à sua segurança na aplicação, principalmente no âmbito de exposição laboral.

Mas o que faz das tão promissoras nanopartículas, em especial o nanotubo de carbono, moléculas que mereçam ser tratadas com cautela e potencialmente perigosas para a saúde e meio ambiente?

A primeira justificativa é a própria falta de conhecimento do comportamento destas nanomoléculas. Embora a grande maioria delas seja constituídas de materiais muito bem conhecidos, tal conhecimento se refere à escala macroscópica; como esses materiais sofrem efeito quântico na escala nanométrica, espera-se que suas características físico-químicas sejam alteradas e, por consequência, seus efeitos biológicos. A segunda justificativa, que se refere mais precisamente aos nanotubos de carbono, é que as mesmas características que os fazem ser bastantes promissores, também fazem dele um perigo em potencial. Sua estrutura fina e comprida, fazendo alusão à uma fibra e bastante persistente (MULLER, HUAUX *et al.*, 2005; ELGRABLI, FLORIANI *et al.*, 2008; CROUZIER, FOLLOT *et al.*, 2010) faz com que ela se pareça muito com outro material bastante conhecido e já banido do mercado: o asbesto. Deste modo, espera-se que nanotubos de carbono possam causar doenças pulmonares como fibrose e mesotelioma (RYMAN-RASMUSSEN, CESTA *et al.*, 2009; SHVEDOVA e KAGAN, 2010).

#### **1.4 - Asbesto e a fibrose pulmonar**

O termo asbesto vem do grego e quer dizer indestrutível, imortal. Este termo é utilizado de forma genérica para designar um uma variedade fibrosa (proporção comprimento:diâmetro de pelo menos 3:1) de sais minerais metamórficos que é utilizado em vários segmentos como fibrocimento, materiais de fricção (ex.: embreagens e freios automobilísticos), têxtil, vedação, papéis e papelões (ex.:

isolamento térmico e elétrico), filtros e isolantes térmicos. Sua utilização foi amplamente aceita na indústria devido às suas várias qualidades como (DE CARVALHO, 2009; LAZARUS e PHILIP, 2011):

- Alta resistência à tração;
- Baixa condutividade térmica;
- Resistência à erosão, produtos químicos e microrganismos;
- Durabilidade
- Flexibilidade
- Facilidade para ser tecido ou fiado

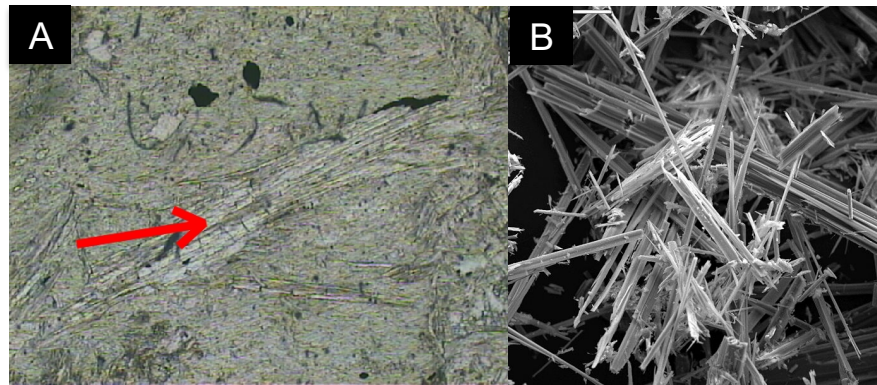
Historicamente, a utilização do asbesto é datada de pelo menos há 4500 anos, quando habitantes de uma região da Finlândia utilizavam o pó do asbesto para reforçar potes e materiais de cozimento, que eram feitos de barro. Sua utilização industrial é datada de mais ou menos 1850, nos EUA, quando a antofilita (um dos tipos de asbesto) começou a ser minerado nos EUA.

Ao final do século 19 já surgiam, na Europa, associações entre o asbesto e desordens pulmonares, mas foi somente 56 anos mais tarde, em 1906, é que a primeira morte relacionada ao asbesto foi relatada pelo parlamento britânico. A notícia impulsionou o início das pesquisas a respeito da segurança do material e, somente 18 anos mais tarde, em 1924, é que o primeiro diagnóstico de asbestose foi publicado (LAZARUS e PHILIP, 2011).

O perigo do asbesto vem de sua organização estrutural. Ele é composto por feixe de fibras que, por sua vez, são constituídos por fibras extremamente finas e facilmente separáveis e com tendências a formarem pó (Figura 11). Como possuem alta proporção comprimento:diâmetro, estas fibras tendem a flutuar pelo ar o que as torna facilmente respiráveis ou engolidas. Isto acontece porque as fibras de amianto, consideradas respiráveis, possuem até 3 µm de diâmetro e pelo menos 5 µm de comprimento (DE CARVALHO, 2009). Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer) a exposição ao asbesto pode ocorrer de duas maneiras:

- Exposição ocupacional:

- 624
  - a exposição ocupacional é a principal forma de exposição e contaminação;
- 627
  - ocorre, principalmente, através da inalação das fibras de amianto, que podem causar lesões nos pulmões e em outros órgãos;
- 630
  - a via digestiva também deve ser considerada como fonte de contaminação.
- Exposição ambiental:
  - 633
    - contato dos familiares com roupas e objetos dos trabalhadores contaminados pela fibra;
    - residir nas proximidades de fábricas, minerações ou em áreas contaminadas (solo e ar) por amianto;
  - 636
    - freqüentar ambientes onde haja produtos de amianto degradados;
  - 639
    - presença do amianto livre na natureza ou em pontos de depósito ou descarte de produtos com amianto



642 **Figura 11: Fotografia e fotomicrografia mostrando a estrutura macro e microscópica da**  
**antofilita, um tipo de asbesto.** a) Cristais de antofilita incrustado em Talco Xisto (Aumento 5x), b)  
645 microfotografia de varredura de cristais de antofilita (Aumento desconhecido). Fontes:  
<http://www.rc.unesp.br/igce/petrologia/nardy/bdantofilita.html> e  
[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Anthophyllite\\_asbestos\\_SEM.jpg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Anthophyllite_asbestos_SEM.jpg).

648 Apesar do crescente aumento das evidências documentando os perigos da  
utilização do asbesto, as indústrias ainda continuam a utilizá-lo, principalmente nos  
países em desenvolvimento, devido às leis fracas e as notificações de saúde  
inadequadas. Todavia, o estabelecimento do nexos causal relacionando o asbesto às  
651 doenças pulmonares é muito difícil por dois motivos: 1) não se sabe exatamente o  
mecanismo na qual o asbesto causa dano pulmonar e 2) as doenças provocadas pelo  
asbesto (asbestose, câncer de pulmão, trato digestivo, ovário e mesotelioma),  
654 segundo o INCA, são doenças de longo prazo, que demoram a manifestar os  
sintomas, geralmente por volta de 20-36 anos (KANAREK, 2011; LAZARUS e PHILIP,  
2011).

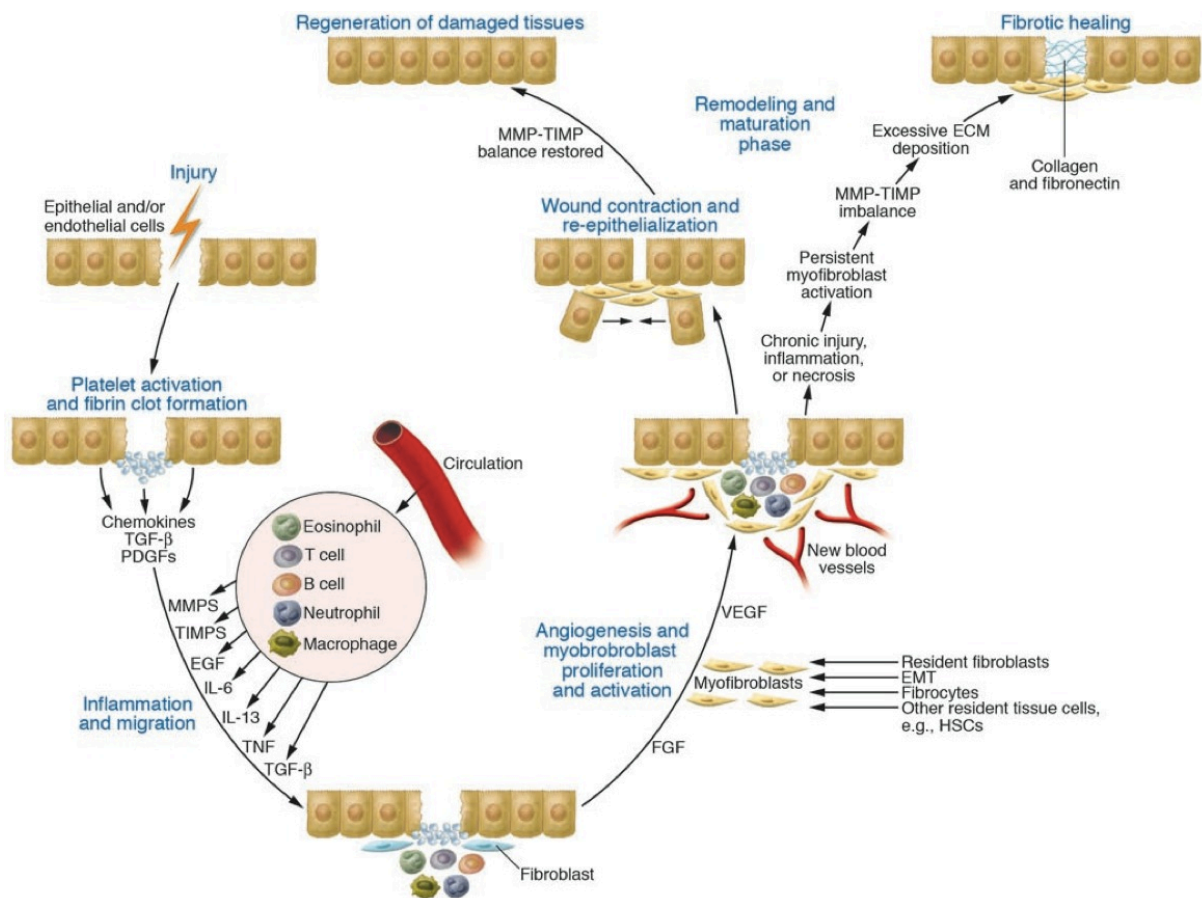
657 Particularmente, a asbestose, é caracterizada pela deposição das fibras de  
asbesto nos alvéolos pulmonares, provocando uma reação inflamatória seguida de  
fibrose (INCA). A substituição de tecido pulmonar funcional por matriz extracelular  
660 (colágeno, ácido hialurônico, proteoglicanos e fibronectina) trás ao indivíduo dois  
problemas concomitantes: 1) devido ao menor número de alvéolos, a área de troca  
gasosa diminui e, 2) com a deposição de MEC, há o enrijecimento do parênquima  
663 pulmonar. Estas duas consequências diminui a capacidade respiratória do paciente o  
que limita suas atividades físicas incapacitando-o até mesmo ao trabalho. Nos casos  
mais graves, até as atividades mais simples ficam comprometidas (INCA, 2012).

666 Não está estabelecida ainda uma exposição mínima ao asbesto que  
desencadeie a situação supracitada, uma vez que exposições relativamente curtas  
podem ter um efeito clínico significativo décadas depois. Neste tipo de situação, a

669 fibrose começa da região subpleural e, à medida que progride, atinge os dutos  
670 alveolares, septos e até os bronquíolos terminais (LAZARUS e PHILIP, 2011).

671 A fibrose pulmonar inclui um grupo heterogêneo de enfermidades que são  
672 caracterizadas por uma destruição progressiva e irreversível da arquitetura pulmonar  
causada pela formação de cicatrizes (tecido fibroso) que, em seu último estágio, levam  
673 ao mal funcionamento do órgão, prejuízo da troca gasosa e até mesmo a morte por  
674 insuficiência respiratória. Nos piores casos, após diagnosticada, o indivíduo tem uma  
expectativa de 2-6 anos. Considerando que atualmente não há tratamento efetivo  
675 contra a progressão da doença, a única solução para o caso é o transplante de pulmão  
676 (WYNN, 2007).

677 Apesar de benéficos, se não forem bem controlados, os processos  
cicatrizantes podem se tornar maléficos, resultando em uma alteração substancial da  
678 matriz extracelular e a formação de cicatrizes permanentes. Por este motivo, a fibrose  
pulmonar é geralmente descrita como um processo cicatrizante que saiu do controle  
(Figura 12) (WYNN, 2007; WYNN, 2011).

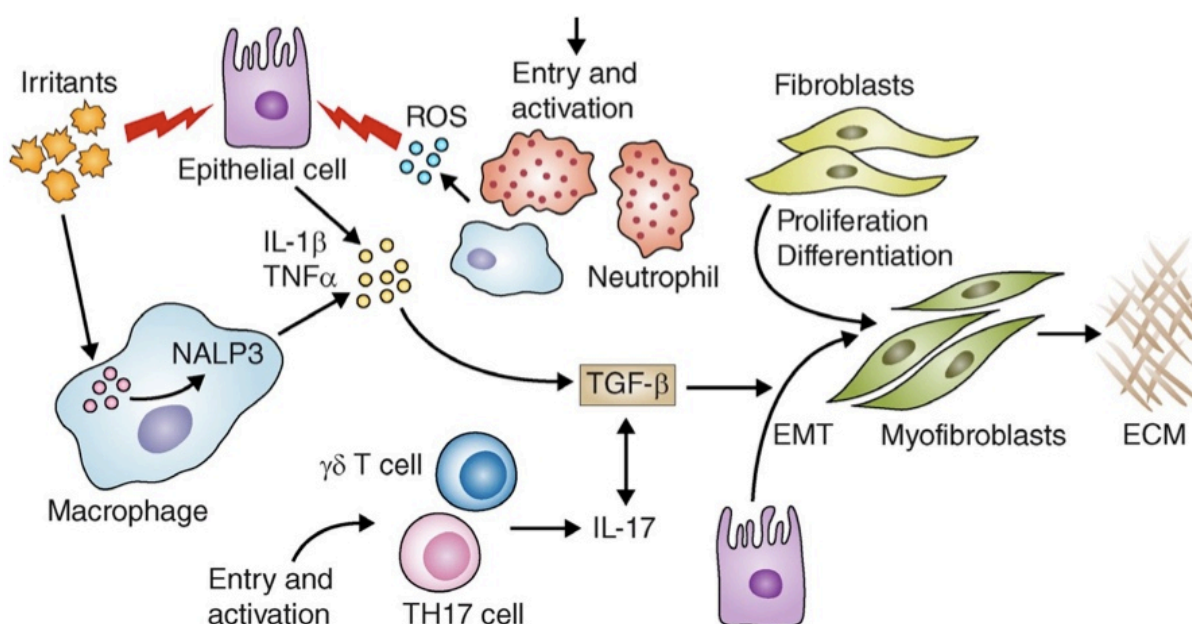


684

**Figura 12: Esquema representativo do processo de lesão/cicatrização e suas etapas principais.**  
(WYNN, 2007)

687 Ainda que causada por uma grande variedade de fatores etiológicos, a  
 grande maioria das fibroses pulmonares possuem em comum a persistência de um  
 elemento irritante que é capaz de manter a produção de fatores de crescimento,  
 690 enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas pró-fibrogênicas que, em  
 conjunto, vão culminar no progressivo remodelamento e destruição tecidual (WYNN,  
 2007).

693 No caso da asbestose, acredita-se que a fibrose pulmonar ocorra no eixo  
 IL-1 $\beta$ -TNF $\alpha$ -TGF- $\beta$ 1. Neste caso, as fibras de asbesto seriam capazes de danificar as  
 células epiteliais e serem reconhecidas por macrófagos através dos receptores  
 696 NALP3 resultando assim na produção de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Em conjunto,  
 estas citocinas vão atrair e ativar leucócitos, como por exemplo neutrófilos e  
 macrófagos. Quando ativos estas células causam no pulmão um estresse oxidativo  
 699 local que lesaria ainda mais as células epiteliais, levando a uma produção de citocinas  
 ainda maior. IL-1 $\beta$  ainda induz a produção de TGF- $\beta$ 1 que, além de estimular a  
 diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, induz a reprogramação de células  
 702 epiteliais transformando-as em um tipo de "fibroblast-like cell" que irão então produzir  
 matriz extracelular. Além desta via principal, TGF- $\beta$ 1 parece atuar em conjunto com  
 IL-6 no balanço das respostas T regulatória e Th17 efetora exacerbando e  
 705 cronificando a resposta inflamatória (NEURATH e FINOTTO, 2011; WYNN, 2011)  
 (Figura 13).



708 **Figura 13: esquema ilustrativo da resposta imune pulmonar contra agentes particulados como o asbesto por exemplo.** Extraído de (NEURATH e FINOTTO, 2011; WYNN, 2011)

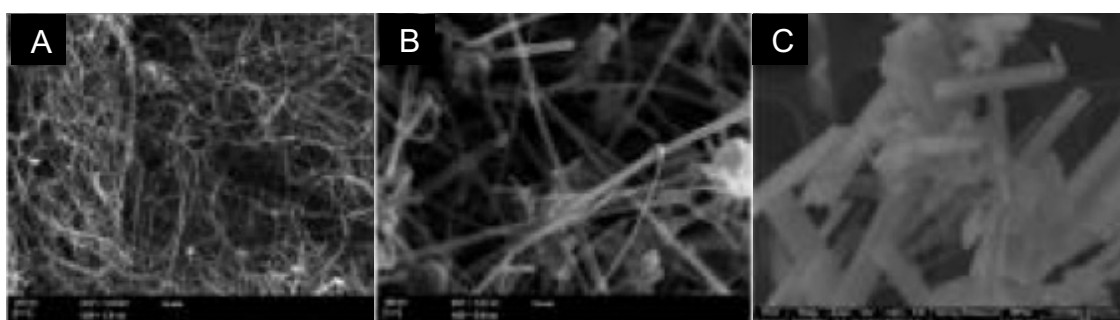
711 Não obstante, ROS, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  são capazes de induzir a fibrose através  
de uma via independente de TGF- $\beta$ 1. Estas citocinas são capazes estimular a  
produção do inibidor 1 de ativação do plasminogênio (PAI-1). Esta proteína atua  
inibindo o ativador do sistema plasmina/plasminogênio, que age degradando a MEC  
714 e impedindo seu acúmulo protegendo assim o pulmão de um processo fibrogênico  
(NEURATH e FINOTTO, 2011; WYNN, 2011).

717 Além do mecanismo citado, algumas outras vias e acontecimentos foram  
propostas para ajudar a explicar e compreender o início e manutenção do processo  
de fibrose em geral. Estes são: a participação de células CD4<sup>+</sup> Th1 (ex.: CXCL10,  
CXCL11, CCR3 e IFN $\gamma$ ), células CD4<sup>+</sup> Th2 (ex.: IL-33, IL-4, IL-5 e IL-13), participação  
720 do sistema renina/angiotensina (ANGII), mutações genéticas (ex.: integrinas  $\beta$ 1),  
alterações epigenéticas (ex.: demetilações no DNA) e apoptose de células epiteliais  
alveolares (WYNN, 2007; LIU, BERI *et al.*, 2010; NEURATH e FINOTTO, 2011;  
723 WYNN, 2011).

Desta forma, devido às várias vias que participam e controlam o processo  
de fibrose pulmonar, este é um mecanismo complexo e que, apesar de grande avanço  
726 ter sido feito na sua compreensão, nenhum mecanismo que seja eficiente foi proposto  
para reverter ou até mesmo pará-lo.

### 1.5 - Toxicidade e biocompatibilidade dos nanotubos de carbono

729 Nanotubos de carbono são moléculas que possuem o diâmetro da ordem  
de nanômetros enquanto seu comprimento pode atingir vários micrômetros, portanto  
podem ser considerados fibras. Dessa forma, uma comparação inevitável sempre é  
732 feita quando se trata desse assunto: o asbesto. Tal comparação ganha mais força  
ainda com o fato de que, dependendo do tipo de nanotubo que se está analisando,  
pode também haver muita semelhança física com a fibra do asbesto, implicando então  
735 em um risco inerente ao nanotubo de carbono (Figura 14).





738 **Figura 14: Fotomicrografia eletrônica de varredura comparando o aspecto morfológico de dois**  
**nanotubos de carbono diferentes (a: *Long Tangled MWNT* e b: *Long Needle-Like MWNT*) e o**  
**asbesto (c). Aumento desconhecido (PALOMÄKI, VÄLIMÄKI *et al.*, 2011).**

741 Devido ao seu risco em potencial, sua possível aplicação em modelos  
biológicos e o aumento expressivo de sua produção nos últimos tempos fizeram com  
que segurança da exposição humana e ambiental a este material fosse questionada,  
assim, dúvidas sobre sua segurança e risco para a saúde foram levantadas,  
744 abordando principalmente a exposição laboral.

Desta forma surgiu uma nova modalidade de estudo advinda da toxicologia:  
a nanotoxicologia. Este novo campo visa avaliar com segurança os problemas  
747 especiais que possam ser causados por nanopartículas, preenchendo assim as  
lacunas no conhecimento que a “macrotoxicologia” não cobria (DONALDSON,  
STONE *et al.*, 2004; OBERDÖRSTER, OBERDÖRSTER *et al.*, 2005). Um bom  
750 exemplo disso é o ouro, que em escalas macroscópicas, é inerte; no entanto, em  
escala nano é bastante interativo, tanto que é usado para imageamento médico e  
“drug delivery”.

753 Assim como para o asbesto, a exposição aos nanotubos de carbono podem  
ocorrer de duas maneiras distintas: a exposição ocupacional/laboral, na qual o  
indivíduo é exposto ao nanomaterial durante a fase de produção ou então durante  
756 alguma aplicação biomédica; ou então a exposição ambiental/acidental, na qual o  
indivíduo está exposto às nanopartículas presentes no ambiente, produtos comerciais  
ou até mesmo em suas aplicações biomédicas (BOCZKOWSKI e LANONE, 2007).  
759 Devido ao grande aumento da demanda por este material que vem ocorrendo, seu  
risco à exposição laboral também aumentou significativamente e, como sua  
aerolização é muito fácil, um dos principais órgãos que vem sendo estudado é o  
762 pulmão (DAVOREN, HERZOG *et al.*, 2007).

Desta forma existem vários trabalhos na literatura que citam o nanotubo  
como um agente inflamatório e que é capaz de induzir danos a longo prazo em  
765 diferentes modelos (ratos/camundongos e instilação/aspiração). Neste caso, foi  
verificado que uma exposição única a nanotubos foi capaz de induzir uma resposta  
aguda (1 a 7 dias), com aumento do número de células no BAL, aumento da  
768 concentração de citocinas (ex.: IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 e outras), LDH e de proteínas  
totais. Após um mês ou mais, foi observado também que na maioria dos casos ainda

se observava sinais de inflamação como número de células e concentração de  
771 citocinas aumentada no BAL, mas mais do que isso, havia grande formação de uma  
inflamação granulomatosa com grande deposição de MEC intersticial (MULLER *et al.*,  
2005; SHVEDOVA, KISIN *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009; PORTER, HUBBS *et al.*,  
774 2010). Além disso, nanotubos de carbono foram capazes de atingir a pleura e persistir  
no parênquima pulmonar por até 90 dias após uma única instilação intranasal (LAM,  
JAMES *et al.*, 2004; PORTER *et al.*, 2010).

777 Neste mesmo contexto, entretanto, Crouzier (2010) observou que a  
instilação intranasal de nanotubos de carbono em camundongos induz a produção de  
citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e Leptina) no soro sanguíneo de forma aguda, porém  
780 ele foi incapaz de observar efeito oxidativo nos pulmões. Em outra situação, Elgrabli,  
Abella-Gallart e colegas (2008) também falharam em observar inflamação pulmonar  
induzida por NTCs. Neste experimento, os autores verificaram que ratos instilados  
783 intratraquealmente com MWCNT, apresentaram uma taxa de apoptose de  
macrófagos alveolares elevada, mas que não apresentaram inflamação pulmonar,  
não reproduzindo assim dados inflamatórios anteriores.

786 Devido ao grande potencial biológico e médico, trabalhos também foram  
feitos no sentido de se verificar a compatibilidade destes compostos em situações de  
exposição biomédica. Neste contexto, estudos verificaram o comportamento de  
789 nanotubos de parede simples funcionalizados com uma molécula com propriedades  
quelantes e marcadas com Índio ( $^{111}\text{In}$ ). O grupo de Singh (2006) verificou que,  
quando injetados intravenosamente, estes compostos são eliminados rapidamente da  
792 circulação, pela via renal, exibindo uma meia vida em torno de 3 horas. Além disso,  
estes compostos não são retidos em nenhum órgão o sistema retículo-endotelial e  
que, análises de amostras de urina indicaram que os nanotubos foram excretados  
795 intactos, sem nenhum tipo de degradação.

Além dos experimentos tradicionais de toxicologia e inflamação, alguns  
autores também investigaram os efeitos dos nanotubos de carbono no contexto *in*  
798 *vitro*. Esta abordagem permite que se compreenda as interações que os nanotubos  
de carbono podem ter com diferentes tipos celulares, principalmente aqueles  
presentes nos pulmões (ex.: fibroblastos, células epiteliais e macrófagos).

801 Wang e Mercer (2010) avaliaram o efeito da exposição de fibroblastos  
humanos pulmonares ao NTC. Neste estudo, seu grupo verificou que NTCs não

possuem um efeito tóxico nestas células, ao contrário, ele observou que houve uma  
804 estimulação para que elas se multiplicassem sem que os níveis de LDH no  
sobrenadante fosse alterado. Além do mais, este grupo verificou que a exposição a  
nanotubos de carbono induziu a produção de colágenos tipo I/III e de  
807 metaloproteinase-9, indicando que NTCs não só estimulam a multiplicação de  
fibroblastos, mas que também podem ter um efeito direto na sua ativação. Em uma  
situação diferente, Cui e colaboradores (2005) verificaram que a exposição a  
810 nanotubos de carbono diminuiu a proliferação de células HEK293 pois causou sua  
apoptose, assim como também diminuiu sua habilidade de adesão celular.

Focando em outro tipo celular, as células epiteliais pulmonares (NHBE e  
813 A549), Herzog e Byrne (2009) também verificaram que NTCs são capazes de  
estabelecer uma interação. Neste estudo, foi achado que a exposição a nanotubos de  
carbono induz a produção de ROS por estas células mas que a resposta celular é  
816 fortemente dependente do tipo de meio usado para a dispersão. Estudando também  
células A549, Davoren (2007) observaram que NTCs causaram muito pouca  
toxicidade nestas células e que eles não foram capazes de invadir o meio  
819 citoplasmático, apesar dessa exposição ter causado o aumento do número de corpos  
lamelares que armazenavam surfactante e a perda da integridade da membrana  
plasmática.

Finalmente, estudos com macrófagos *in vitro* mostraram que a exposição  
822 a nanotubos de carbono foi capaz de causar estresse oxidativo nas células  
acarretando em sua perda de viabilidade (CHENG, MÜLLER *et al.*, 2009; KAGAN,  
825 KONDURU *et al.*, 2010). Estes nanocompostos foram capazes de invadir a célula  
tanto pelo método ativo quanto pelo passivo e frequentemente atingindo o citoplasma  
e até mesmo o núcleo (CHENG *et al.*, 2009). Além disso, macrófagos expostos a  
828 nanotubos também foram induzidos a produzir TNF $\alpha$  (MULLER *et al.*, 2005).

Embora evidências sobre a toxicidade de nanotubos tem aumentado, os  
mecanismos que expliquem este efeito não são muito conhecidos. Neste âmbito  
831 Palomaki e colegas (2011) desenvolveram um trabalho com macrófagos humanos  
primários no qual eles compararam três tipos de nanotubos de carbono (curto, longo  
“*tangled*” e longo “*needle-like*”) com o asbesto. Neste trabalho eles relataram que  
834 somente os nanotubos longos e o asbesto, após 6 horas de exposição, invadiram o  
meio intracelular sem atingir o núcleo e que, somente os nanotubos longos

“*needle-like*” e o asbesto foram capazes de induzir a produção de IL-1 $\beta$ . Além disso, eles também demonstraram que a indução de IL-1 $\beta$  é via Inflamassoma NLRP3 e dependente de ROS, catepsina B, receptor P2X<sub>7</sub> e Src/Syk. Desta forma, os autores sugerem que há um dimorfismo na resposta celular causada pelos NTCs, na qual um dos fatores cruciais é a morfologia do composto. Observações que também foram relatadas por Yamashita (2010).

Até o momento, fica claro que as nanopartículas, especialmente os nanotubos de carbono, são materiais com grande potencial de uso no futuro. No entanto os dados sobre sua nanotoxicologia ainda são muito contraditórios, o que coloca em dúvida sua viabilidade para uso a curto prazo. Um dos motivos que contribuem para tal controvérsia é que a tecnologia avança num passo muito mais rápido que a pesquisa sobre sua segurança. Dessa forma, muitas das técnicas que são atualmente utilizadas para avaliar tais efeitos podem não ser as mais adequadas, o que pode levar a falsos resultados, principalmente em experimentos *in vitro*, que lançam mão de muitas técnicas colorimétricas (ex.: MTT, Griess, Alamar Blue, Neutral Red) uma vez que pode haver interação entre os nanotubos e os corantes levando a falsas leituras de absorbância (WÖRLE-KNIRSCH e PULSKAMP, 2006; ALI-BOUCETTA, AL-JAMAL *et al.*, 2011) Outra suspeita já levantada por pesquisadores é de que, como moléculas que possuem grande relação comprimento-diâmetro podem adsorver proteínas em sua superfície, ensaios como por exemplo o ELISA podem estar sendo sub-interpretados (MONTEIRO-RIVIERE e INMAN, 2006). Com isto, Hurt e colegas (2006), que também notaram estes problemas, sugerem que se tenha cuidado ao realizar ensaios desse tipo em situações que se tenha grandes quantidades desses materiais.

Sendo assim, a máxima cautela deve ser tomada quando se trata do manuseio de nanopartículas, especialmente nos locais de produção, onde os valores reais de exposição na qual as pessoas estão sujeitas não é muito conhecido e a dose mínima e segura para exposição também não está determinada. Para outros tipos de aplicação, como na área médica, mais estudos são necessários para que sua utilização, mesmo que em doses muito baixas seja considerada segura.

**867 2 - Justificativa**

O recente avanço da tecnologia em nanoescala e o crescente mercado da nanotecnologia elevaram esta área da ciência a um dos mais altos patamares de investimento e pesquisa.

Entretanto, a criação de novas moléculas nanoestruturadas e produtos que as contém em sua formulação avança em um ritmo muito mais elevado do que estudos sobre sua própria segurança. Desta forma, moléculas novas são estudadas com técnicas que foram desenvolvidas para outros propósitos, o que pode levar a resultados conflitantes e estimados de forma errônea.

Este quadro é exatamente o que temos para os nanotubos de carbono, no qual existe na literatura uma inconsistência dos que se deve principalmente à falta de padronização como o tipo de nanotubo utilizado, modelo de inflamação a ser utilizado, dose, técnicas *in vitro* validadas, estudos comparativos e outros.

Sendo assim, o estudo da resposta inflamatória de diferentes tipos de nanotubos é uma importante linha de desenvolvimento em pesquisa. Analisar e avaliar a inflamação causada por estas moléculas acrescerá informações importantes sobre o comportamento das diferentes nanopartículas em sistemas biológicos e seus efeitos tóxicos. Este modelo pode ainda ser aplicado no estudo sobre as causas da fibrose pulmonar, facilitando assim o entendimento desta patologia e seus possíveis alvos de intervenção farmacológica.

### 888 3 - Objetivos

#### 3.1 - Objetivos Gerais

891 Estudar os possíveis efeitos tóxicos dos nanotubos de carbono em modelos *in vitro* e *in vivo* visando a avaliação dos aspectos inflamatórios e possíveis efeitos fibrogênicos.

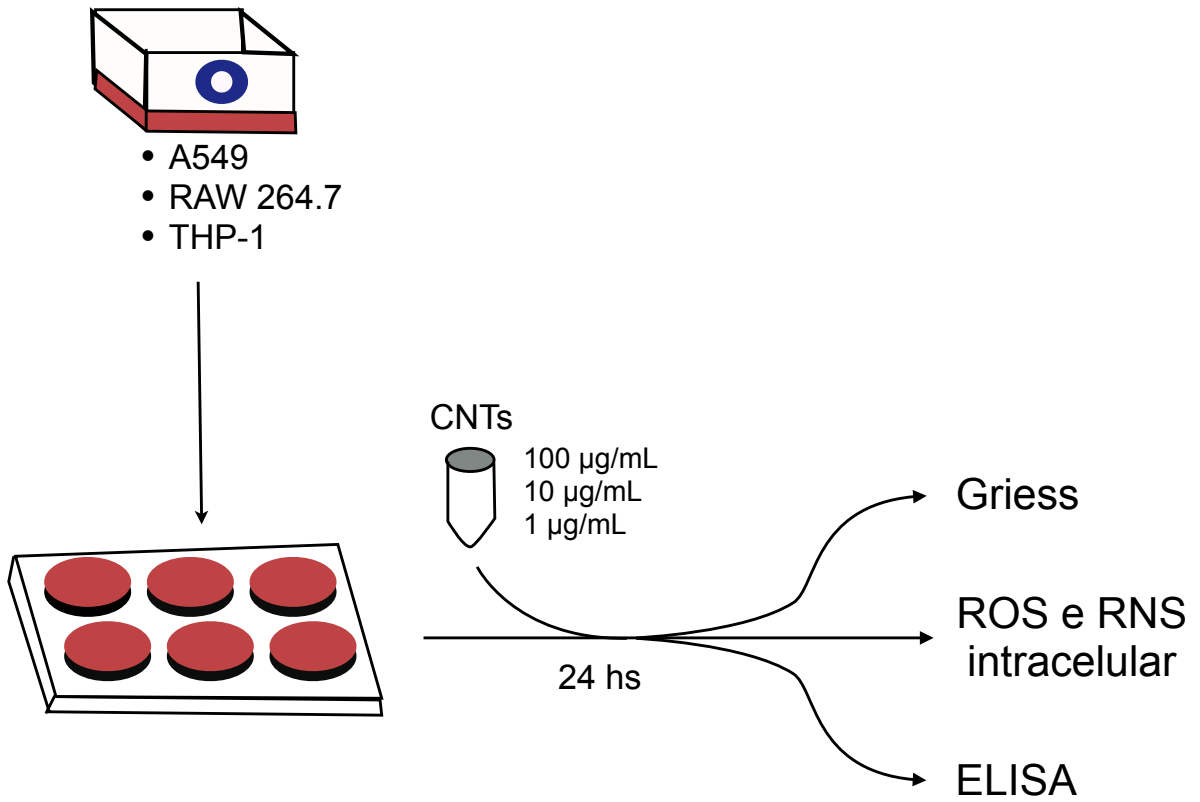
#### 3.2 - Objetivos Específicos

- 894
- Estudar *in vitro* a interação dos nanotubos de carbono com três linhagens diferentes de células que constituem o pulmão (A549, RAW 264.7 e THP-1);
- 897
- Estudar o infiltrado inflamatório pulmonar causado por uma única instilação intranasal com nanotubos de carbono diluídos em PBS e SFB;
- 900
- Estudar a produção de mediadores inflamatórios no parênquima e no espaço alveolar causado por uma única instilação intranasal de nanotubos de carbono diluídos em PBS e SFB;
- 903
- Estudar a deposição de colágeno no parênquima pulmonar causada por uma única instilação intranasal de nanotubos de carbono diluídos em PBS e SFB;
- 906

#### 4 - Materiais e Métodos

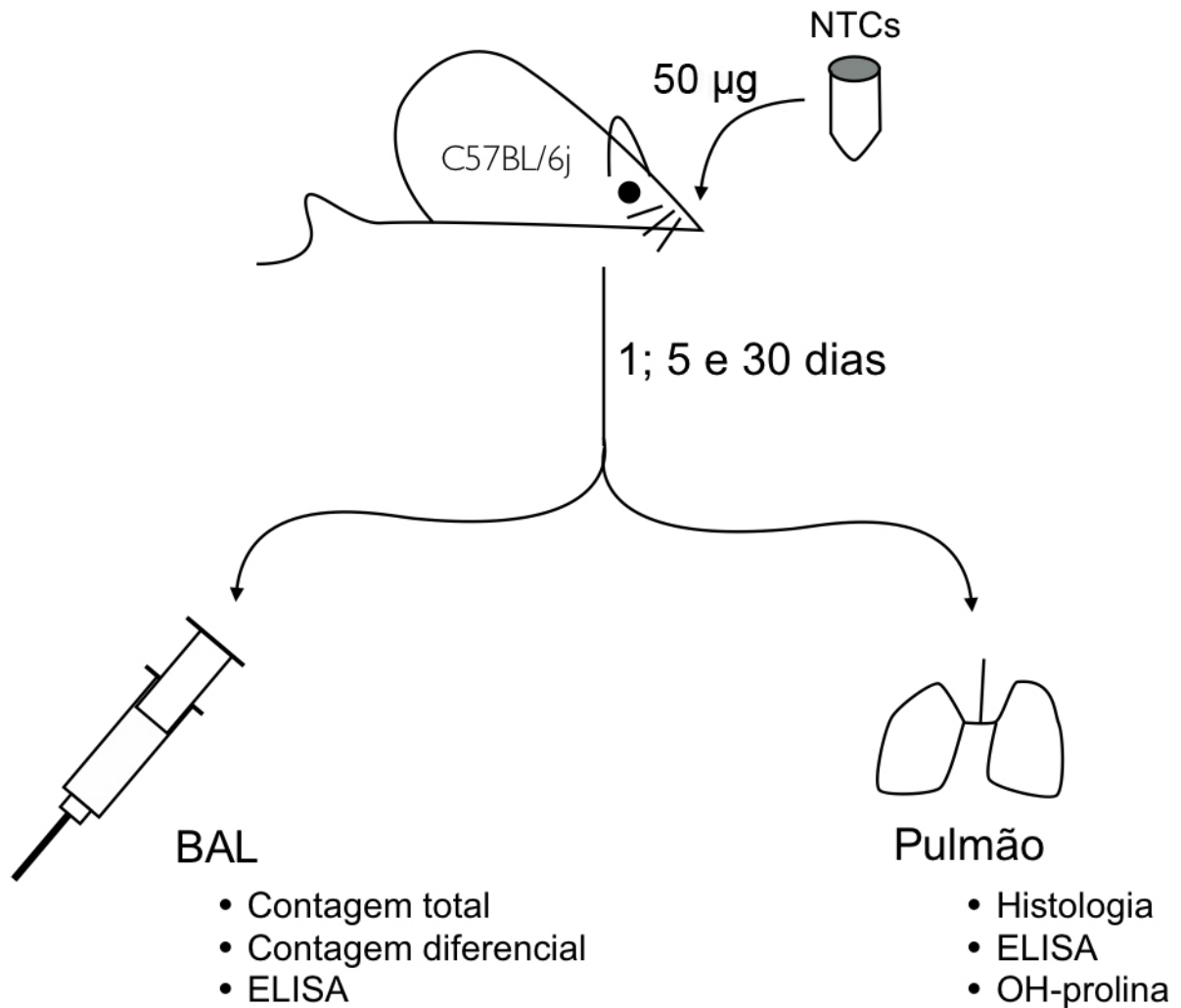
#### 909 4.1 - Desenho experimental

#### 4.1.1 - *In vitro*



912

### 4.1.2 - *In vivo*

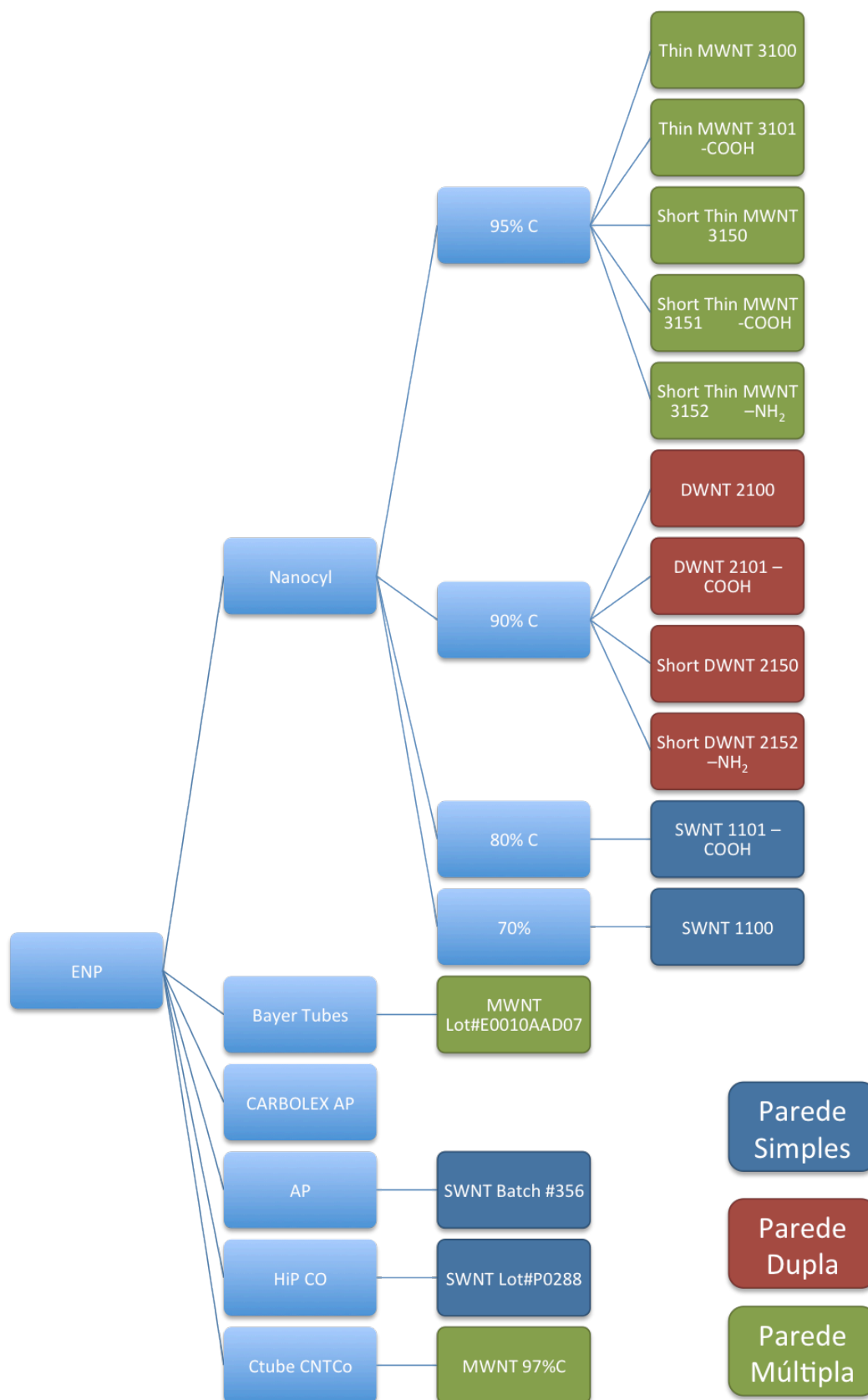


915

### 4.2 - Nanotubos de carbono

918 Neste estudo foram utilizados vários tipos diferentes de nanotubos de carbono, cada um com sua peculiaridade e características. A Figura 15 mostra uma classificação destes compostos levando-se em consideração sua morfologia.





921 **Figura 15: Esquema mostrando todos os nanotubos de carbono disponíveis para o trabalho assim como suas características físicas, morfológicas e seu grau de pureza.**

924 Estes compostos foram gentilmente cedidos pelas professoras Adelina  
Pinheiro Santos e Clascídia Aparecida Furtado, ambas membro do Centro de  
Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN). Os NTCs utilizados neste estudo,  
927 em sua grande maioria, foram comprados da empresa belga Nanocyl  
(<http://www.nanocyl.com/>) cujas especificações dos compostos 1100 e 3150, que são  
os mais utilizados neste trabalho, encontram-se anexadas ao final deste (Anexos 1 e  
930 3).

As análises químicas destes dois compostos também se encontram  
anexadas neste trabalho e foram feitas previamente também pelas professoras  
933 Adelina e Clascídia. O seu anexo ao trabalho foi previamente autorizado por elas  
(Anexos 2 e 4).

### 4.3 - Solubilização dos Nanotubos de Carbono

936 Nanotubos de carbono não funcionalizados são insolúveis em soluções  
aquosas, ao tentar solubilizá-los o que se obtém é uma suspensão momentânea  
desses compostos que, dependendo de suas características, voltam a se aglomerar  
939 instantaneamente ou em alguns minutos.

Para solubilizá-los, os nanotubos foram pesados em uma balança de  
precisão com 5 casas decimais (DenverCall PI-225D, Denver Instrument) e  
942 suspendidos em PBS (livre de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ) ou SFB inativado a uma concentração de  
200  $\mu\text{g/mL}$  (ensaios *in vitro*) ou 1,25  $\mu\text{g/mL}$  (ensaios *in vivo*) em um tubo de vidro  
(solução estoque).

945 Os tubos então foram primeiramente sonicados por 10 minutos em um  
sonicador de banho (Bransonic 3: 55 KHz, 12W *output*) e depois sonicados por mais  
10 minutos, porém em um sonicador de ponta (Fisher Scientific, 22 KHz, 50 W *output*)  
948 com 40% de *output*. A sonicação foi feita em duas etapas porque foi observado que,  
desta maneira, ocorria menor agregação na ponta do sonicador.

As soluções estoques foram armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  e antes do  
951 uso, as amostras foram sonicadas em um sonicador de banho por 5 minutos  
(Bransonic 3: 55 KHz, 12W *output*).

#### 4.4 - Microscopia Raman

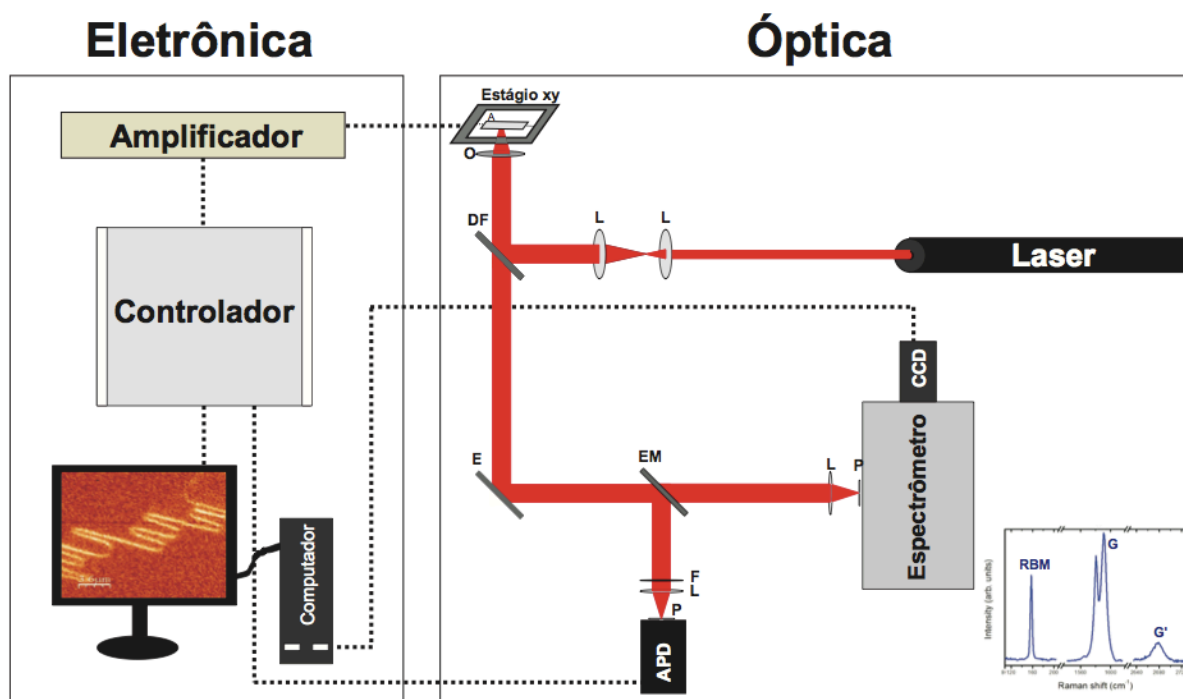
954 Para verificar a integridade dos nanotubos utilizados neste estudo e  
também para a comprovação de que o que se via nas lâminas histológicas era de fato  
nanotubos de carbono, foi utilizado a Espectroscopia Raman, em colaboração com o  
957 professor Ado Jório (Departamento de Física – ICEX/UFMG).

Para verificar a integridade das amostras de nanotubos, 10 µL da solução  
contendo os NTCs foi aplicado entre lâmina e lamínula e levadas ao microscópio  
960 Raman. No caso das lâminas histológicas, depois de prontas, foram levadas ao  
microscópio Raman sem nenhum preparo adicional.

No microscópio Raman (Figura 16), as amostras são excitada por um laser  
963 He-Ne de comprimento de onda 632.8 nm. Após a excitação pelo laser, o sinal óptico  
emitido pela amostra passa pela lente objetiva e é detectado pelo Detector Fotodiodo  
Avalanche (APD) ou passa para o espectrógrafo, sendo detectado pelo Dispositivo  
966 Integrado Carregado (CCD).

O APD fornecerá uma imagem do campo excitado pelo laser, sendo  
possível detectar onde se localizam os NTCs nesse campo. Tendo a localização exata  
969 dos nanotubos na amostra, o espectrômetro medirá o espectro Raman emitido por  
eles. Cada substância apresenta um diferente espectro Raman, o qual já é bastante  
conhecido para os NTCs.

972



**Figura 16: Representação esquemática do microscópio Raman confocal.** A amostra é colocada em óleo de imersão em contato com a objetiva. O laser He-Ne incide sobre a amostra e o espectro Raman é detectado pelo APD ou espectrômetro CCD. Os dados são controlados e analisados pela parte eletrônica. (L) Lentes; (DF) Divisor de Feixes; (O) Objetiva; (E) Espelho; (EM) Espelho Móvel; (F) Filtro; (P) Pinholes; (A) Amostra. (SOARES, 2011).

## 4.5 - Estudos *in vitro*

### 4.5.1 - Cultivo celular, preparação das placas e estimulação

#### 981 4.5.1.1 Linhagens celulares

Neste estudo, foram utilizadas células RAW 264.7 (Cat. TIB-71, linhagem macrófaga murina), A549 (Cat. CCL-185, parênquima pulmonar humano) e THP-1 (TIB-202, linhagem monocítica humana), todas da ATCC. Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Cultilab, São Paulo) suplementadas em 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, São Paulo) e antibióticos (penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50 µg/mL)) numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

##### 4.5.1.1.1 Linhagem RAW 264.7

Células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram utilizadas para os ensaios de Griess e análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) intracelulares.

993 Para o ensaio de Griess,  $1 \times 10^6$  células/poço foram plaqueadas em placas  
de 48 poços e deixadas *overnight* para aderirem à placa. No dia seguinte, o meio  
antigo foi retirado e colocado um novo meio já contendo os estímulos. Neste  
996 experimento foram utilizados os 16 tipos de nanotubos de carbono diluídos em PBS  
como estímulo (nas concentrações de 100; 10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e, como controle positivo,  
MSU (300  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 hs, o sobrenadante foi coletado e submetido à Reação de  
Griess (100  $\mu\text{L}$ ).

999 Para a detecção da produção de ROS e RNS intracelular,  $1,2 \times 10^5$   
células/poço foram plaqueadas em duas placas distintas de 96 poços e deixadas  
*overnight* para aderirem à placa. No dia seguinte o meio antigo foi retirado e colocado  
1002 um novo meio já contendo os estímulos. Neste experimento foram utilizados os 16  
tipos de nanotubos de carbono diluídos em PBS como estímulo (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e, como  
controle positivo, LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 1005 4.5.1.1.2 Linhagem THP-1

Células THP-1 foram utilizadas para avaliar a produção de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$   
por macrófagos quando estimulados por NTCs.

1008 Para o ensaio,  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas em duas placas distintas  
de 96 poços. A placa destinada para a dosagem de TNF $\alpha$  foi diferenciada *overnight*  
com LPS (5 ng/mL) e a placa destinada à dosagem de IL-1 $\beta$  foi diferenciada e primada  
1011 *overnight* com LPS (100 ng/mL). No dia seguinte, o meio antigo foi retirado e colocado  
um novo meio já contendo os estímulos. Neste experimento foram utilizados os 2 tipos  
de nanotubos de carbono diluídos em PBS (1100 e 3150) como estímulo (nas  
1014 concentrações de 100; 10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e, como controle positivo, MSU (250  $\mu\text{g/mL}$ ).  
Após 24 hs, o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise por ELISA.

#### 4.5.1.1.3 Linhagem A549

1017 Células A549 foram utilizadas para avaliar a produção de IL-8 por células  
epiteliais pulmonares quando estimulados por NTCs.

1020 Para o ensaio,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas placa de 96 poços e  
deixadas *overnight* para aderirem à placa. No dia seguinte, o meio antigo foi retirado  
e colocado um novo meio já contendo os estímulos. Neste experimento foram  
utilizados os 2 tipos de nanotubos de carbono diluídos em PBS (1100 e 3150) como

1023 estímulo (nas concentrações de 100; 10 e 1 µg/mL) e, como controle positivo, MSU  
(250 µg/mL). Após 24 hs, o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior  
análise por ELISA.

#### 1026 **4.5.2 - Quantificação de nitrito pelo Método de Griess**

O nitrito é um produto da oxidação do NO e, por isto, a concentração de nitrito no sobrenadante da cultura celular foi utilizada como índice da produção de NO.  
1029 Como o nitrito é um produto que se perde facilmente e o ensaio é bastante simples e rápido, as dosagens foram feitas logo ao final do experimento, antes de congelar as amostras.

1032 A dosagem de nitrito total no sobrenadante celular foi realizada pela adição de 50 µL do reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% naftilenodiamina em ácido fosfórico 2,5% - todos SIGMA, USA) a uma amostra de 100 µL de sobrenadante de  
1035 cultura. Após um intervalo de 5 minutos para que se ocorra a reação, a densidade ótica a 540 nm foi obtida utilizando um leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices). A concentração total de nitrito foi calculada pela comparação com a  
1038 densidade ótica a 540 nm de uma curva padrão de nitrito de sódio preparado em meio RPMI 1640, composta de soluções nas seguintes concentrações: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,5 µM, 3,25 µM e 1,75 µM.

1041

#### **4.5.3 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) intracelulares**

1044 O ensaio para detecção de ROS e RNS utiliza-se de sondas que emitem fluorescência quando são oxidadas pelas espécies reativas específicas com a qual reagem. Sabe-se que a fluorescência detectada veio de uma sonda que se  
1047 internalizou na célula, porque a sonda só é oxidada no meio intracelular.

Para a realização do ensaio, cada placa previamente semeada com células RAW 264.7 foi então pré-incubada por 30 min com uma das sondas para os radicais:  
1050 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína (DAF-FM, sensível para NO) [10µM] ou 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, sensível para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [20µM], e então estimuladas com nanotubos de carbono (100 µg/mL) ou LPS (1 µg/mL). Os controles para este  
1053 ensaio foram meio de cultura e meio de cultura + sonda.

As células foram acompanhadas por aproximadamente 2 hs com leituras no fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader, Biotek) a cada 10 minutos com um filtro para o comprimento de onda de 520 nm.

#### **4.5.4 - Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas pelo método do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*)**

As amostras do BAL e sobrenadante da cultura celular foram analisados diretamente, sem diluição, ao passo que os homogenatos de pulmão foi utilizada a diluição de 1:3 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina.

Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8 foram medidos no sobrenadante de cultura celular, enquanto que no BAL e pulmão, além das duas primeiras citocinas supracitadas, foi analisado também os níveis de IL-6, TGF- $\beta$ 1 e CCL2 (MCP-1) utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo próprio fabricante, resumidamente descrito abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorre durante 18 horas à 4° C. A reação é bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma). A reação é detectada pela incubação com um anticorpo de detecção, conjugado à biotina, por 2 horas, à temperatura ambiente, seguido de incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidina Pharmingen” - 1:4000). A revelação é feita com OPD (o-fenilenodiamina dicloridrato - Sigma). Após 30 minutos a reação é interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A leitura foi feita no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com filtro para o comprimento de onda de 492 nm.

### **4.6 - Estudos *in vivo***

#### **4.6.1 - Animais**

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6j com idade entre 8 e 10 semanas fornecidos pelo CEBIO (Centro de Bioterismo) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram previamente vermifugados

1086 com sulfóxido de albendazol 6% e solução de ivermectina 1% por uma semana e, após a semana de tratamento, foi dado o espaço de uma semana para o início dos experimentos.

1089 Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, com livre acesso à ração e água, e sob ciclo claro/escuro de 12hs em estantes com circulação de ar filtrado.

#### 4.6.2 - Instilação Intranasal de NTCs e eutanásia

1092 Previamente à instilação intranasal, os animais foram anestesiados com Quetamina/Xilazina (respectivamente 60 mg e 4 mg/kg, em solução salina 0.9%) pela via intraperitoneal.

1095 Após anestesia completa, cada animal foi instilado com 50 µg de NTC em um volume final de 40 µL de PBS ou SFB pela via intranasal, com o auxílio de uma micropipeta. Camundongos controle passaram pelo mesmo processo, porém com PBS ou SFB puros ao invés do NTC.

1098 A eutanásia dos animais foi feita por overdose de anestésico, sendo que o projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (Anexo 5).

1101 Foram coletados o lavado bronco-alveolar (BAL) e os pulmões dos animais. Todo o material foi mantido em gelo e, em seguida, armazenado no freezer a -20°C, até posterior processamento e uso.

#### 1104 4.6.3 - Lavado Bronco-alveolar (BAL) e coleta dos pulmões

Após a eutanásia do animal, o primeiro procedimento a ser feito foi a coleta do BAL.

1107 Primeiramente expõe-se a traqueia do animal retirando cuidadosamente o timo e o tecido muscular que a envolve. Uma vez exposta, com o auxílio de uma pinça e o uso de uma tesoura, faz-se uma pequena incisão na traqueia que é por onde o animal será canulado (cateter de polipropileno de 1,7 mm). Após canulado, com uma  
1110 seringa de 1 mL faz-se o lavado das vias aéreas 3 vezes com cada 1mL de PBS, duas vezes, tentando recuperar o maior volume possível (total de aproximadamente 2 mL).



1113 Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos através do arco  
aórtico para que os vasos sanguíneos e capilares pulmonares fossem lavados. Para  
isto, fez-se um pique no coração para permitir que o sangue extravasasse e, com uma  
1116 seringa de 3 mL, injetou-se do lado direito do arco 3 mL de PBS.

Após perfundido, o pulmão esquerdo (lobo único) foi coletado para a  
histologia e o pulmão direito (4 lobos) para posterior processamento e análise de: (1)  
1119 deposição de colágeno, (2) citocinas/quimiocinas, (3) atividade de N-acetil-  
glicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO).

#### 4.6.4 - Contagem total e diferencial das células do BAL

1122 Logo após coleta do BAL, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por  
10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e o  
precipitado foi ressuspenso com 100 µL de tampão (BSA 1%, NaN<sub>2</sub> 0,1%).

1125 Para a contagem total, as células foram coradas com solução de Turk e  
contadas com uma Câmara de Neubauer em uma diluição 1:10 utilizando um  
microscópio óptico com uma objetiva de 40x. No momento da diluição o volume de  
1128 cada amostra foi anotado para posterior correção.

Para a contagem diferencial,  $5 \times 10^3$  células foram diluídas em 100 µL de  
BSA 3% e preparadas por *cytospin* (Cytospin III, Shandon) – centrifugação 10 minutos  
1131 a 450 rpm em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com panótico e a  
contagem foi feita em microscópio óptico com uma objetiva de 100x utilizando-se óleo  
de imersão. Os caracteres de diferenciação das células foram: morfologia nuclear,  
1134 coloração nuclear e coloração citoplasmática, permitindo a diferenciação das células  
em: eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares.

#### 4.6.5 - Processamento tecidual para dosagem de citocinas/quimiocinas, NAG e 1137 MPO

Após a coleta dos órgãos, 100 mg do pulmão direito foi pesado para o  
processamento para análise de citocinas, NAG e MPO.

1140 A amostra foi homogeneizada em 1 mL de uma de uma solução para  
extração de citocinas (NaCl 0,4 M, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de  
benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI aprotinina) e

1143 então centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado  
em um novo microtubo e congelado para análises posteriores.

O precipitado foi homogeneizado novamente, porém em 1.9 mL de solução  
1146 tampão 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M NaEDTA; pH 4,7) e novamente  
centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi submetido a uma  
lise hipotônica (1,5 mL de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de NaCl 1,6%  
1149 + Glicose 5%, após 30 segundos) e uma nova homogeneização.

Neste ponto o processamento das amostras para NAG e MPO se  
diferenciam, por isto, as amostras foram divididas em 2 tubos diferentes. Após a  
1152 divisão, todos os tubos foram novamente centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos  
a 4°C e o sobrenadante desprezado.

Nos tubos para NAG, foi adicionado 0,8 mL de uma solução Salina  
1155 0,9%/Triton X-100 0,1%, as amostras foram homogeneizadas e congeladas. Nos  
tubos para MPO, foi adicionado 0,8 mL de tampão 2, (0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% HETAB;  
pH 5,4). As amostras foram homogeneizadas e congeladas.

#### 1158 **4.6.6 - Dosagem da atividade de NAG tecidual**

A reação se inicia com a adição de 100 µL do reagente p-nitrofenil-N-acetil-  
β-D-glicosaminida (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M,  
1161 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM a 100 µL das amostras  
previamente processadas, diluídas em tampão citrato/fosfato e plaqueadas em placa  
de micro ensaio com 96 poços. Incuba-se a reação por 10 minutos a 37°C e, ao final  
1164 desse tempo, foi adicionado às amostras 100 µL do tampão glicina 0,2 M (Glicina 0,26  
M, NaCl 0,26 M, NaOH 0,26 M; pH 10,6). As leituras das placas foram feitas no leitor  
de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de  
1167 onda de 405 nm.

O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva-padrão de  
NAG, feita pela coleta de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados  
1170 com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados).

#### **4.6.7 - Dosagem da atividade de MPO tecidual**

O ensaio começa com uma lise térmica (criofratura). Para isso, as amostras  
1173 já processadas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas 3 vezes

consecutivas. Após a lise, 25 µL das amostras diluídas em tampão 2 são plaqueadas em uma placa de 96 poços. Adicionou-se então 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) a 1176 concentração final de 1,6 mM e incubou-se a placa a 37°C por 5 minutos,

Ao final deste período, foi adicionado às amostras 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluída 1179 em tampão 2 a uma concentração fina de 0,002% e incubou-se a placa novamente por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> às amostras para parar a reação e a placa foi lida no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular 1182 Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base em curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados 1185 com 3 mL de caseína 5% (dados não mostrados).

#### 4.6.8 - Ensaio para quantificação de Hidroxiprolina (OH-prolina) tecidual

O ensaio de OH-prolina visa estimar a quantidade de colágeno depositada 1188 em determinado tecido, desta forma, podemos identificar e quantificar se um órgão sofreu um processo de fibrose após um processo inflamatório. O ensaio é feito seguindo um protocolo modificado de (REDDY e ENWEMEKA, 1996).

Para o ensaio, 100 mg de tecido pulmonar foi pesado, homogeneizado com 1191 um homogeneizador de tecidos (Power Gen 1000, Fisher Scientific) em solução salina 0,2% e liofilizado. Após liofilização, o tecido passou por uma hidrólise alcalina (NaOH 1194 2M) a 120°C por 30 minutos.

Feita a hidrólise, as amostras foram mantidas a 65°C para se manterem 1197 líquidas e 50 µL das amostras, padrões e branco (água destilada) foram transferidos para um microtubo de 2 mL. Após, o reagente oxidante Cloramina T (0,056 M) foi adicionado ao tubo e este foi incubado em temperatura ambiente por 25 minutos. A reação é detectada com a adição do Reagente de Erlich (1M), que é o cromóforo, e 1200 incubação a 65°C por mais 25 minutos. Parou-se a reação colocando as amostras no freezer por 10 minutos.

Duzentos microlitros amostras e padrões foram então transferidos para 1203 uma placa de 96 poços e a leitura foi feita no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 550 nm.

#### 4.7 - Histopatologia

1206 O pulmão esquerdo foi retirado da cavidade torácica e colocado em uma  
câmara de vácuo, com pressão negativa de  $1,33 \times 10^4$  Pa (VAN KUPPEVELT,  
ROBBESOM *et al.*, 2000), equivalentes a 99,758246 mmHg, durante 10 minutos, para  
1209 que os pulmões fossem inflados, restabelecendo sua morfologia normal. Em seguida,  
as amostras foram fixadas em solução de formalina 10% tamponada, para posterior  
inclusão em parafina. Cada amostra foi cortada e processada em micrótomo para  
1212 obter-se secções de 4  $\mu$ m de espessura em intervalos de 70  $\mu$ m. As secções  
histológicas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Foi realizado  
escore histopatológico seguindo o protocolo de Hubbs (HUBBS, CASTRANOVA *et al.*,  
1215 1997; HUBBS, 2002). Este escore leva em consideração o tipo de inflamação  
(neutrófilica, granulomatosa, necrótica), a intensidade da inflamação (nenhuma,  
mínima, leve, moderada, acentuada e grave) e a extensão da inflamação (nenhuma,  
1218 focal, localmente extensa, multifocal, multifocal a coalescente e difusa). Cada  
avaliação pode variar de 1 a 5 e o escore final tem um total de 10 pontos.

A fibrose pulmonar foi avaliada após coloração com Tricrômico de Gomori  
1221 e posterior análise em microscópios ópticos com objetiva de 20 e 40X.

#### 4.8 - Análise estatística

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos foram feitas  
1224 com o uso do programa GraphPad Prism 4 da empresa GraphPad Software, Inc  
(www.graphpad.com). Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão  
médio) e a diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa  
1227 quando o p valor foi menor que 0,05.

Antes de qualquer análise estatística, os conjuntos de dados foram  
analisados quanto à sua distribuição (*D'Agostino-Pearson omnibus normality test*): se  
1230 eles respeitavam uma distribuição normal, utilizou-se os testes paramétricos, se não,  
os não paramétricos.

Os testes estatísticos utilizados neste estudo foram: Teste t de Student não  
1233 pareado, análise de variância (One-way ANOVA) com o pós-teste de Newman-Keuls  
(dados paramétricos), análise de variância (teste de Kruskal-Wallis) com o pós teste  
de Dunn (dados não paramétricos) ou a análise de variância (Two-way ANOVA) com  
1236 pós teste de Bonferroni.



## 1239 5 - Resultados

### 5.1 - 1ª Parte – Resultados *in vitro*

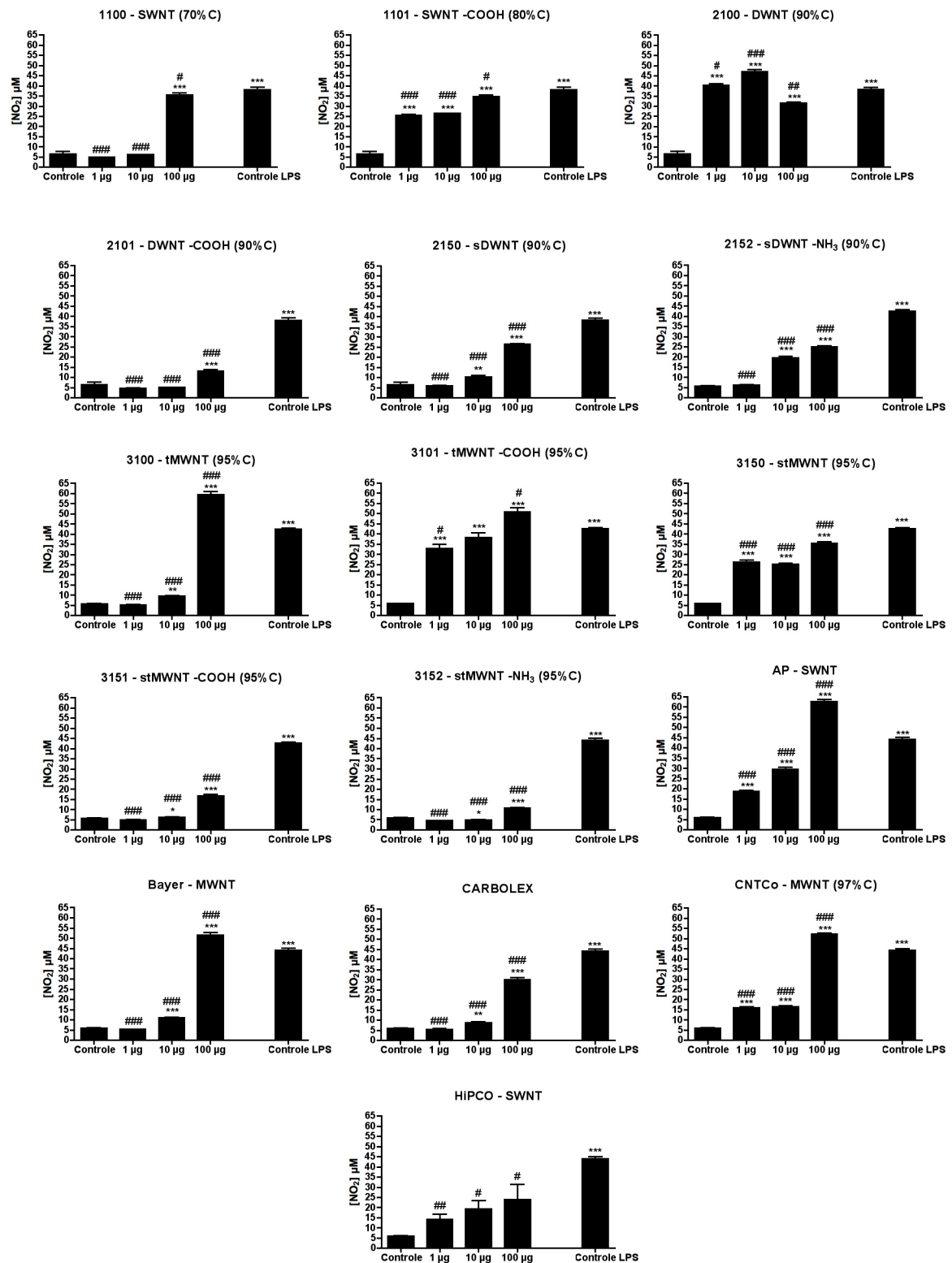
#### 1242 5.1.1 - Nanotubos de carbono induzem a produção de NO em células RAW 264.7 de maneira variada *in vitro*.

1245 Neste experimento inicial foram utilizados todos os 16 tipos de NTCs que estavam disponíveis, dessa maneira, pudemos avaliar o efeito que cada NTC induzia nas células. Foram usadas 3 doses para este experimento: 100 µg/mL; 10 µg/mL e 1 µg/mL com o objetivo de se estipular qual seria a menor dose com efeito indutor nas células.

1248 Os resultados demonstraram que cada composto induz a célula à sua maneira (Figura 17). Dentre os compostos, temos aqueles que:

- não estimulam as células (HiPCO - SWNT),
- 1251 • aqueles que estimulam as células de maneira dose dependente (2150 e AP);
- 1254 • aqueles que na concentração de 1 µg/mL já é capaz de induzir uma alta resposta (1101, 2100, 3101, 3150 e CNTCo);
- aqueles que a menor concentração com efeito indutor é a de 10 µg/mL (2152, 3100, Bayer e CARBOLEX).
- 1257 • aqueles que estimulam as células somente na concentração de 100 µg/mL (1100, 2101, 3151 e 3152);

1260



1263

1266

**Figura 17: A indução da produção de óxido nítrico é uma característica individual de cada nanotubo em células RAW 264.7.** Teste de Griess realizado com o sobrenadante das células 24 hs após o estímulo. Valores expressos em média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. \* (#) =  $p < 0,05$ ; \*\* (##) =  $p < 0,01$  e \*\*\* (###) =  $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao controle e # para diferenças entre os grupos em relação ao Controle LPS.

1269

### 5.1.2 - Nanotubos de carbono induzem as células RAW 264.7 a produzir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO imediatamente após o estímulo *in vitro*.

1272

Com os resultados obtidos no primeiro experimento ficou claro que a grande maioria dos NTC são capazes de interagirem com as células e induzirem uma resposta. Entretanto, achados de Cruzier et al (2010) mostraram que NTCs podem agir como sequestradores de espécies reativas de oxigênio, dessa forma, para tentar diminuir ou neutralizar este efeito, dosamos a produção de radicais livres intracelularmente.

1275

1278

Para isso, células RAW 264.7 foram incubadas com 2 sondas específicas, uma para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outra NO, e depois estimuladas com 100 µg/mL de cada um dos 16 tipos de NTCs disponíveis.

1281

Os resultados mostraram que as células reagem prontamente ao estímulo da maioria dos nanotubos, que levam a uma massiva produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao final de duas horas. Em média, por volta dos 20 minutos pós estimulação, a quantidade de peróxido produzido já é considerada aumentada em relação aos controles. Ao mesmo tempo, o LPS não causou efeito sobre as células (Figura 18). A única exceção neste grupo é o composto 1101, que não foi capaz de induzir a produção de peróxido de hidrogênio.

1284

1287

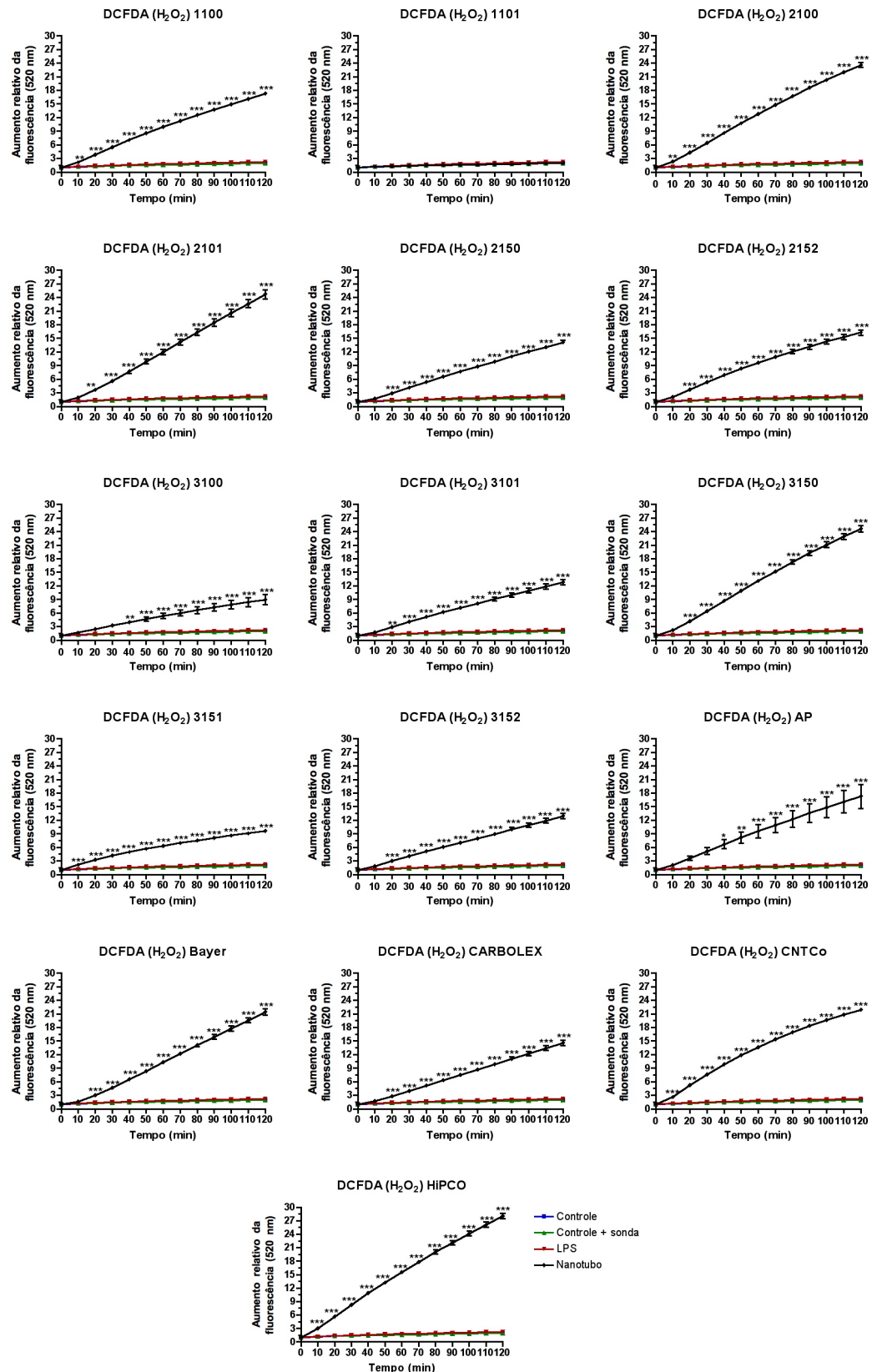
Assim como no experimento anterior, a intensidade como os nanotubos estimularam as células foi variado. Ao final de 2 horas de estimulação, tivemos compostos que não induziram as células e compostos que induziram uma produção de 9 a 26 vezes maior que a do tempo inicial (t=0) (Figura 18).

1290

1293



1296



1299

1302

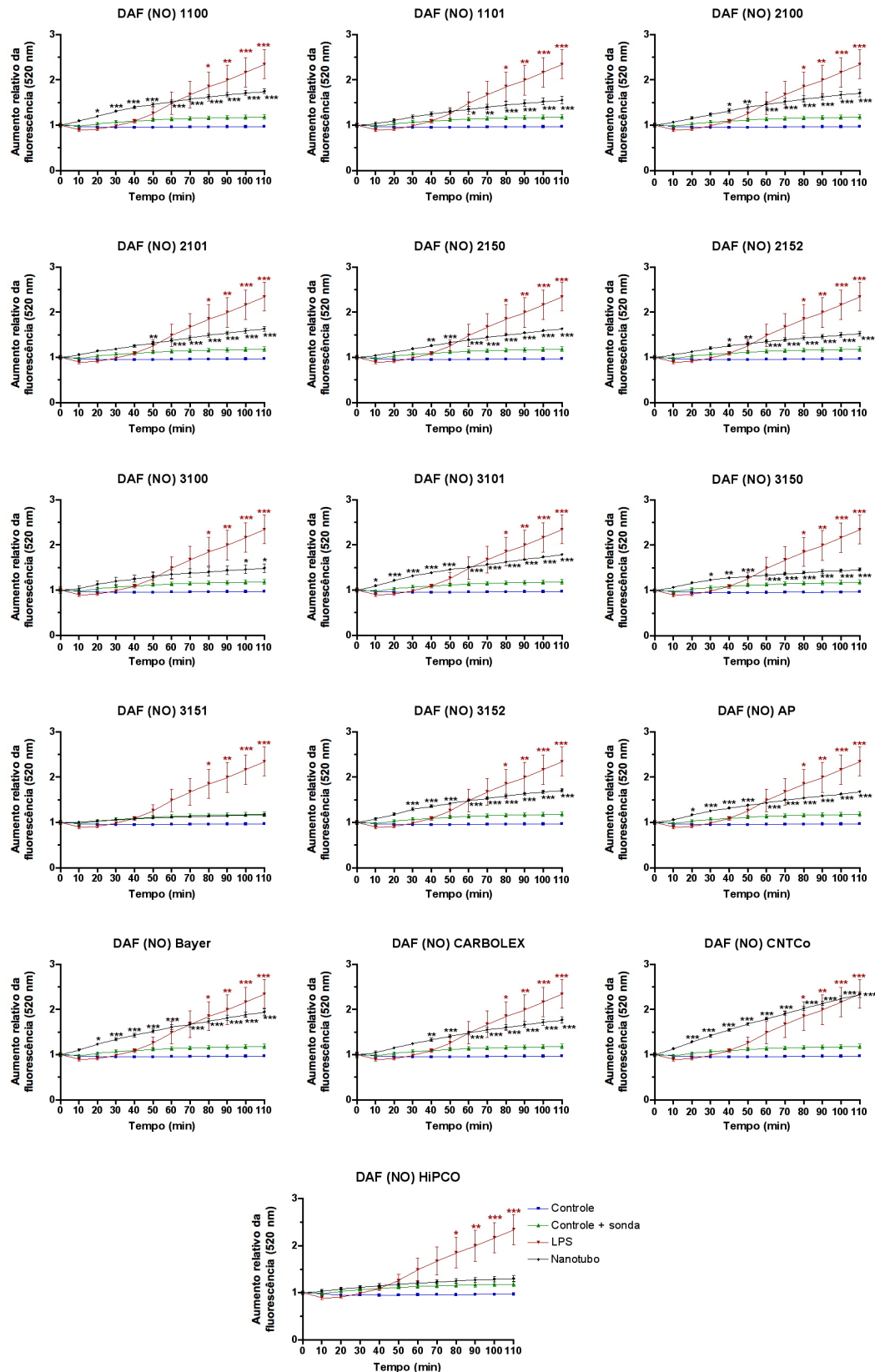
**Figura 18: NTCs induzem a produção intracelular de peróxido de hidrogênio imediatamente após o estímulo em células RAW 264.7.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao controle + sonda.

Concomitantemente, vimos que também houve produção de NO logo após  
1305 a estimulação das células (Figura 19), porém, com uma magnitude muito menor  
quando comparado com a produção de peróxido (Figuras 18 e 19).

Ao contrário da produção de água oxigenada, a produção de NO demorou  
1308 um pouco mais para acontecer, em média aproximadamente 40 minutos após a  
estimulação.

Como esperado, o composto HiPCO não foi capaz de induzir a produção  
1311 de NO, corroborando o teste de Griess, entretanto, o fato de o composto 3151 não ter  
induzido a produção de óxido nítrico foi uma surpresa, uma vez que foi detectado NO  
pelo teste de Griess e ele também foi capaz de induzir a produção de água oxigenada.  
1314 Outro fato curioso, porém o contrário, é o composto 1101, o qual não foi capaz de  
induzir a produção de  $H_2O_2$  mas foi capaz de induzir a produção de NO.

1317



1320

1323

Figura 19: NTCs induzem a produção intracelular de óxido nítrico imediatamente após o estímulo porém com muito menor intensidade comparado à produção de  $H_2O_2$  em células RAW 264.7. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ;

1326

\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao controle + sonda.

### 5.1.3 - Nanotubos de carbono são capazes de induzir a produção de IL-1 $\beta$ mas não de TNF $\alpha$ em células THP-1 *in vitro*.

1329 Até o momento está claro que os nanotubos de carbono, de maneira geral, conseguem interagir com a principal célula do sistema imune no ambiente pulmonar, o macrófago, provocando nele uma resposta ao estímulo.

1332 Para continuar os estudos dois compostos entre os 16 foram selecionados: o composto 1100 (SWNT 70%C) e o composto 3150 (stMWNT 95%C). Os critérios para a escolha foram dois: a resposta induzida e a facilidade de manuseio. O  
1335 composto o composto 1100 induziu uma resposta nas células somente em altas concentrações enquanto que o composto 3150 foi capaz de induzir as células já na menor concentração. Quanto ao manuseio, embora os nanotubos se aglomerassem  
1338 pouco tempo depois, esta característica foi comum a todos os compostos, porém estes dois foram o mais fáceis de se colocar em suspensão inicialmente.

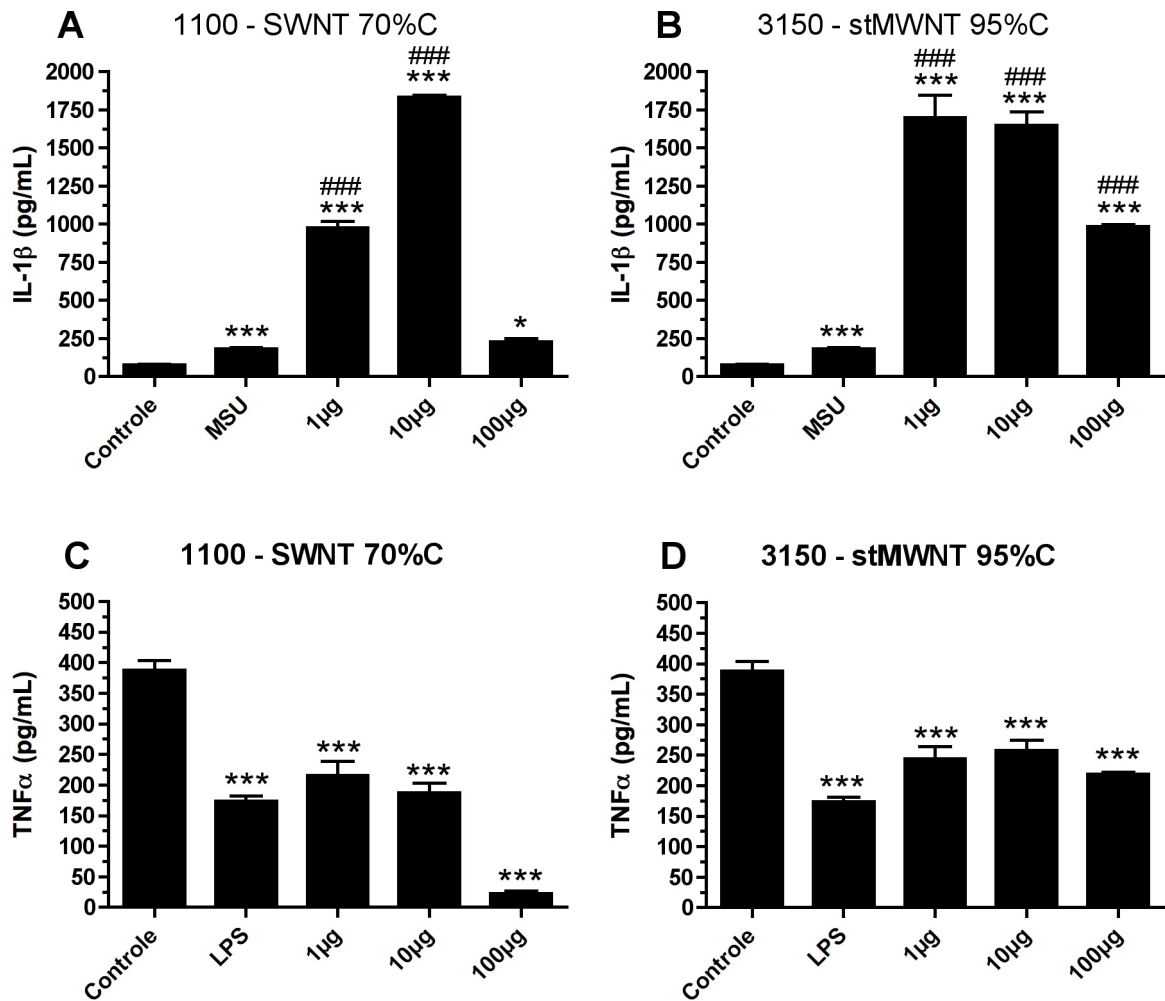
Com os nanotubos selecionados, o próximo passo foi avaliar a resposta  
1341 dos macrófagos quanto à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , dessa forma pode-se avaliar a participação de duas vias inflamatórias extremamente importantes: Inflamassoma e Toll, respectivamente.

1344 Neste experimento células THP-1 foram estimuladas por 24 hs e então o sobrenadante foi coletado para ser posteriormente analisado por ELISA.

Os resultados demonstram uma indução da produção de IL-1 $\beta$  de forma  
1347 dose dependente e estatisticamente significativa para as três doses testadas dos dois compostos. Entretanto a produção de IL-1 $\beta$  na concentração de 100  $\mu$ g/mL ficou mais baixa que a de 10  $\mu$ g/mL, indicando que a dose mais efetiva está entre elas (Figura  
1350 20a e 20b).

Em contrapartida, os dois compostos falharam em induzir a produção de TNF $\alpha$  em qualquer uma das concentrações (Figura 20c e 20d).

1353



1356 **Figura 20: NTCs induzem a produção de IL-1β mas não de TNFα em células THP-1 após 24 hs**  
**de estimulação.** Valores expressos em média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de  
 1359 Newman-Keuls. \*(#)=p<0,05; \*\*(#)=p<0,01 e \*\*\*(###)=p<0,001. \* para diferenças entre os grupos em  
 relação ao controle + sonda e # para diferenças entre os grupos em relação ao MSU ou LPS.

**5.1.4 - O nanotubo de carbono 1100 induz a produção de IL-8 por células A549 *in vitro*, mas o 3150 não.**

1362

Uma vez determinado que os NTCs são capazes de interagir com macrófagos, foi averiguado se eles também são capazes de interagir com outros tipos celulares presentes no pulmão, como por exemplo o tecido epitelial. Neste experimento também foram utilizadas 3 concentrações diferentes de NTCs (1; 10 e 100 µg/mL) para estimular por 24 hs células epiteliais pulmonares A549 e como controle, MSU, um irritante também particulado que é capaz de induzir IL-1β em macrófagos.

1365

1368

1371

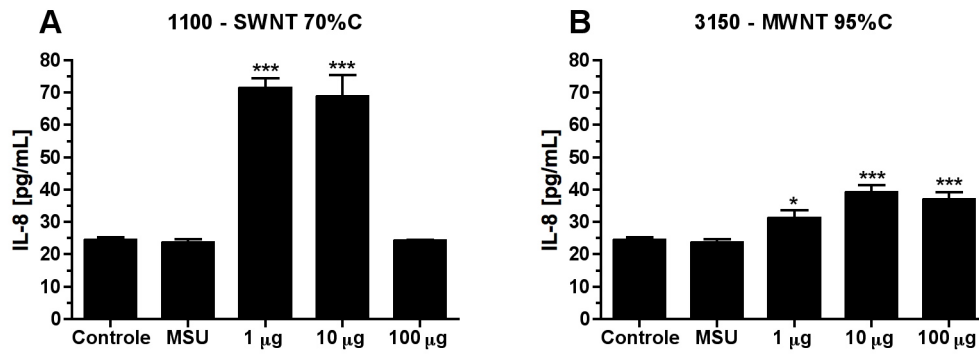
1374

Os resultados demonstraram que o composto 1100 foi capaz de interagir com as células, induzindo uma considerável produção de IL-8 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL ( $p < 0,001$  para ambas). A concentração de 100 µg/mL não foi capaz de induzir a produção de IL-8, indicando que a dose efetiva também está entre 10 e 100 µg/mL (Figura 21a).

1377

O composto 3150 foi capaz de induzir a produção de IL-8 nas três concentrações ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Entretanto sua indução foi bem menos pronunciada que para o composto 1100, o que pode sugerir uma menor interação com as células (Figura 21b).

1380



1383

**Figura 21: NTCs induzem com intensidades diferentes a produção de IL-8 por células A549.**

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls.  $*=p<0,05$ ;

$**=p<0,01$  e  $***=p<0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao controle.

## 5.2 - 2ª Parte – Resultados *in vivo* com PBS

1386 Após os testes iniciais *in vitro* e a confirmação de que nanotubos de  
carbono são capazes de interagir com linhagens de células que estão presentes no  
pulmão, realizamos testes *in vivo* com o objetivo de se avaliar a resposta induzida por  
1389 estes nanocompostos em um ambiente biologicamente ativo e mais complexo.

Nestes experimentos os animais foram instilados com uma dose única de  
NTCs, 50 µg por animal e sacrificados nos tempos de 1, 5 e 30 dias pós instilação  
1392 intranasal (dpi). A dose utilizada foi definida com base na literatura (SHVEDOVA *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2010) e parece ser representativa de uma possível  
exposição ocupacional humana.

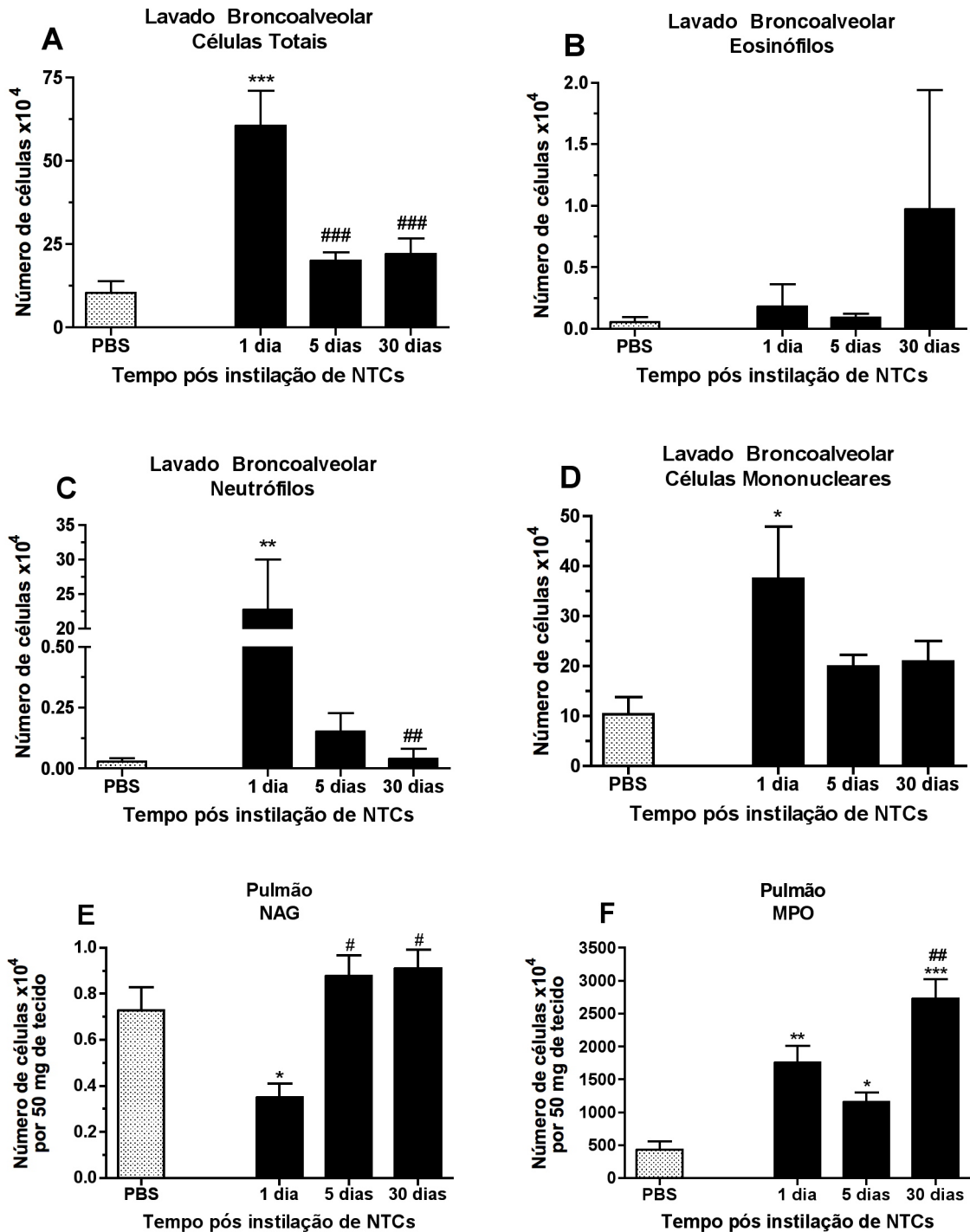
### 1395 5.2.1 - Resultados do composto 1100 (SWNT 70%C)

#### 5.2.1.1 Caracterização do infiltrado inflamatório e fibrose pulmonar induzidos pela instilação intranasal de nanotubos de carbono *in vivo*.

1398 Os resultados demonstraram que houve um aumento do número de células  
totais recolhidas no lavado broncoalveolar no 1º dia pós instilação ( $p < 0,001$ ) quando  
comparado com o grupo controle (PBS). Este número então diminui e, no 5º dpi, ele  
1401 já está igual ao nível basal ( $p < 0,001$ ) se mantendo assim até o 30º dpi ( $p < 0,001$ )  
(Figura 22a). De maneira semelhante, foi observado também um aumento significativo  
do número absoluto de neutrófilos ( $p < 0,01$ ) e de macrófagos ( $p < 0,05$ ) no 1º dpi  
1404 quando comparados com o grupo controle. O número destas células também retornou  
aos níveis basais no 5º dpi (Figuras 22c e 22d) e assim se manteve até o 30º dpi. Não  
houve alteração significativa no perfil de eosinófilos (Figura 22b).

1407 A quantificação de N-acetil-glicosaminidase (NAG) no tecido pulmonar  
mostrou que no 1º dpi houve uma diminuição do número de macrófagos no  
parênquima pulmonar ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais controles (Figura 22e). O  
1410 número de macrófagos voltou aos níveis basais no 5º dpi ( $p < 0,05$ ) e permaneceu  
assim até o 30º dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 22e).





1413

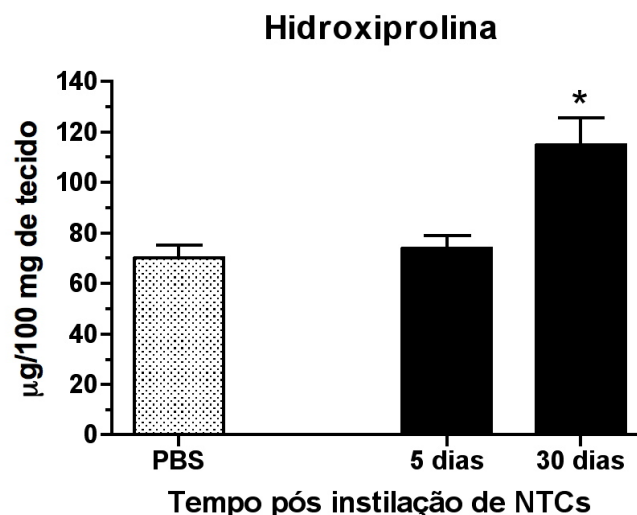
1416 **Figura 22: Recrutamento celular causado pela instilação intranasal do composto 1100 é tempo dependente e ocorre de forma diferenciada entre as vias aéreas e o parênquima pulmonar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de

1419 comparação múltipla de Dunn. \*(#)= $p < 0,05$ ; \*\*(##)= $p < 0,01$  e \*\*\*(###)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos em relação ao 1º dia pós instilação.

1422 a) células totais, b) eosinófilos, c) neutrófilos, d) células mononucleares do lavado broncoalveolar, e) NAG do pulmão, f) MPO do pulmão.

1425 Ao mesmo tempo, a quantificação de mieloperoxidase (MPO), no tecido  
pulmonar, revelou que já no 1º dpi há um aumento no número de neutrófilos ( $p < 0,01$ )  
que persiste até 5º dpi ( $p < 0,05$ ), após esse período, ele aumenta ainda mais e se  
1428 mantém elevado até o 30º dpi ( $p < 0,001$  em relação ao controle e  $p < 0,01$  em relação  
ao 1º dpi) (Figura 22f).

A quantificação de hidroxiprolina tecidual indicou que houve uma deposição  
significativa de colágeno no tecido pulmonar no 30º dia pós instilação ( $p < 0,05$ ) (Figura  
1431 23). Essa deposição é provavelmente tempo dependente com seu início após o 5º dia  
pós instilação, possivelmente no 7º, segundo dados de Shvedova (2008). Dessa  
forma, este dado indica a principal característica da fibrose pulmonar, que seria a  
1434 deposição gradual e contínua de fibras colágenas no parênquima do órgão.



1437 **Figura 23: A deposição de colágeno no parênquima pulmonar induzida pela instilação intranasal  
do composto 1100 ocorre tardiamente à instilação dos NTCs.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM.  
One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls.  $*=p < 0,05$ ;  $**=p < 0,01$  e  $***=p < 0,001$ . \* para  
1440 diferenças entre os grupos em relação ao PBS.

### 5.2.1.2 Caracterização do perfil de citocinas e quimiocinas após a instilação intranasal de nanotubos de carbono *in vivo*.

1443

Após caracterizar a cinética celular e a fibrose causada pela instilação intranasal de NTCs, quantificamos a produção de algumas citocinas e quimiocinas que podem ser importantes durante este processo. Neste trabalho foram dosadas tanto no BAL quanto no tecido pulmonar 4 citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e 1 quimiocina: CCL2. As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  possuem papel pró-inflamatório, enquanto que TGF- $\beta$ 1 e também TNF $\alpha$  exercem um papel pró-fibrogênico. A quimiocina CCL2 função de recrutamento macrofágico e também possui papel pró-fibrogênico sobre fibroblastos.

1446

1449

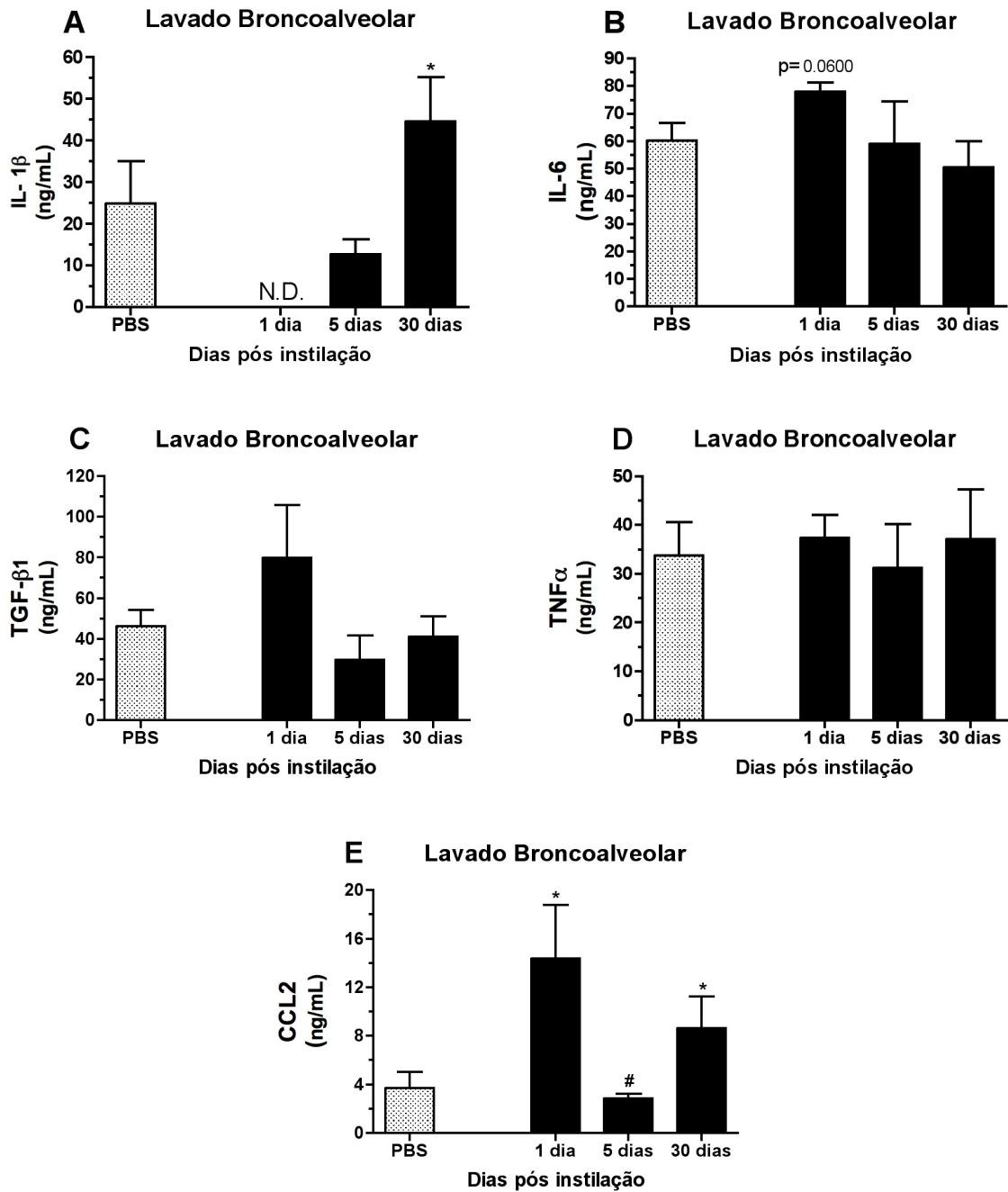
1452

Nossos ensaios falharam em detectar diferenças na produção dessas citocinas no lavado broncoalveolar (Figura 24), exceto para IL-1 $\beta$ , que foi que teve uma produção significativamente maior no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 24a).

1455

A quimiocina CCL2 apresentou um perfil diferente do encontrado para as outras citocinas. Esta se encontra em níveis significativamente aumentado no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ), decai no 5<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$  em relação ao 1<sup>o</sup> dia) e depois volta a subir sendo estatisticamente maior no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 24e).

1458



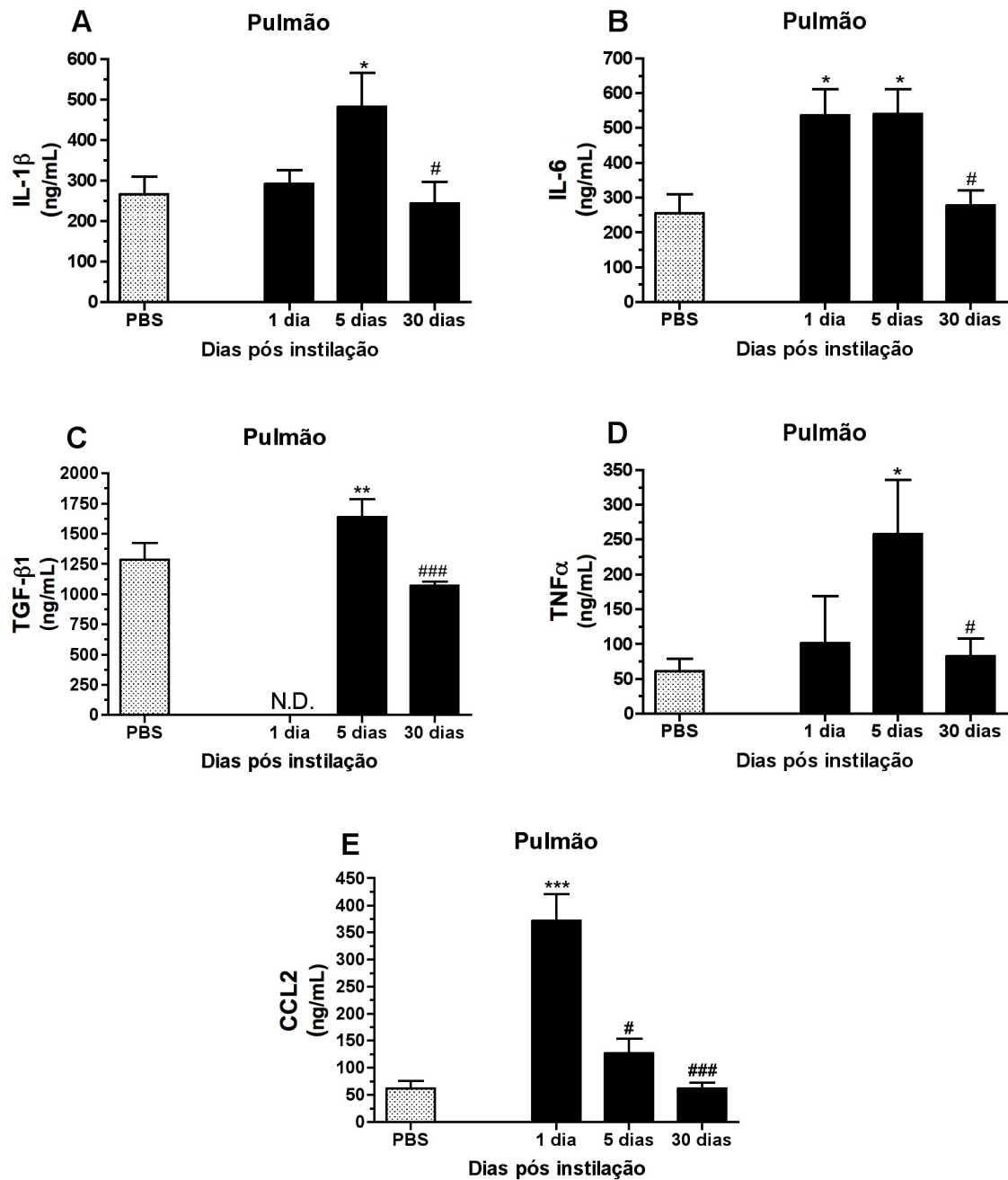
1461

1464 **Figura 24: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 1100 no lavado broncoalveolar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$  e \*\*\*= $p < 0,001$ . \*  
1467 para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos e o 1<sup>o</sup> dpi. a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE do lavado broncoalveolar.

1470 Os níveis destas citocinas também foram dosados no tecido pulmonar. No  
parênquima vimos que a produção de IL-1 $\beta$  foi significativamente maior no 5<sup>o</sup> dpi  
( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle. Entretanto, sua produção retornou  
1473 aos níveis basais no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 25a). IL-6 apresentou uma cinética um  
pouco diferente. Esta citocina apresentou níveis mais elevados já no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ )  
quando comparado ao grupo controle, manteve os níveis mais altos até o 5<sup>o</sup> dpi  
1476 ( $p < 0,05$ ) e retornou à produção basal somente no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 25b)

De forma semelhante à da IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF $\alpha$  apresentaram uma  
cinética com um pico no 5<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente) com um retorno  
1479 aos níveis basais no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente) (Figuras 25c e 25d).

No pulmão, CCL2 se apresentou com uma cinética decrescente. No 1<sup>o</sup> dpi  
sua produção estava elevada quando comparado ao grupo instilado com PBS  
1482 ( $p < 0,001$ ), no entanto, seus níveis começam a cair e, no 5<sup>o</sup> dpi, sua produção já é  
inferior à do 1<sup>o</sup> dia ( $p < 0,01$ ) mas ainda é maior que o grupo controle. Sua produção  
continua a decair até que, no 30<sup>o</sup> dpi, seus níveis são iguais aos do grupo controle  
1485 (Figura 25e)



1488

1491

1494

**Figura 25: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 1100 no parênquima pulmonar.** Valores expressos em média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn. \*(#)= $p < 0,05$ ; \*\*(\*\*)= $p < 0,01$  e \*\*\*(\*\*\*)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos em relação ao 5º dia pós instilação intranasal (para CCL2, em relação ao 1º dpi). a) IL-1β, b) IL-6, c) TGF-β1, d) TNFα, e) CCL2/JE no parênquima pulmonar.

## 1497 5.2.2 - Resultados do composto 3150 (MWNT 95%C)

### 5.2.2.1 Caracterização do infiltrado inflamatório e fibrose pulmonar induzidos pela instilação intranasal de nanotubos de carbono *in vivo*.

1500 Assim como para o composto 1100, os animais também foram instilados com uma dose de 50 µg de NTCs em PBS e analisados os dias 1, 5 e 30 pós instilação intranasal.

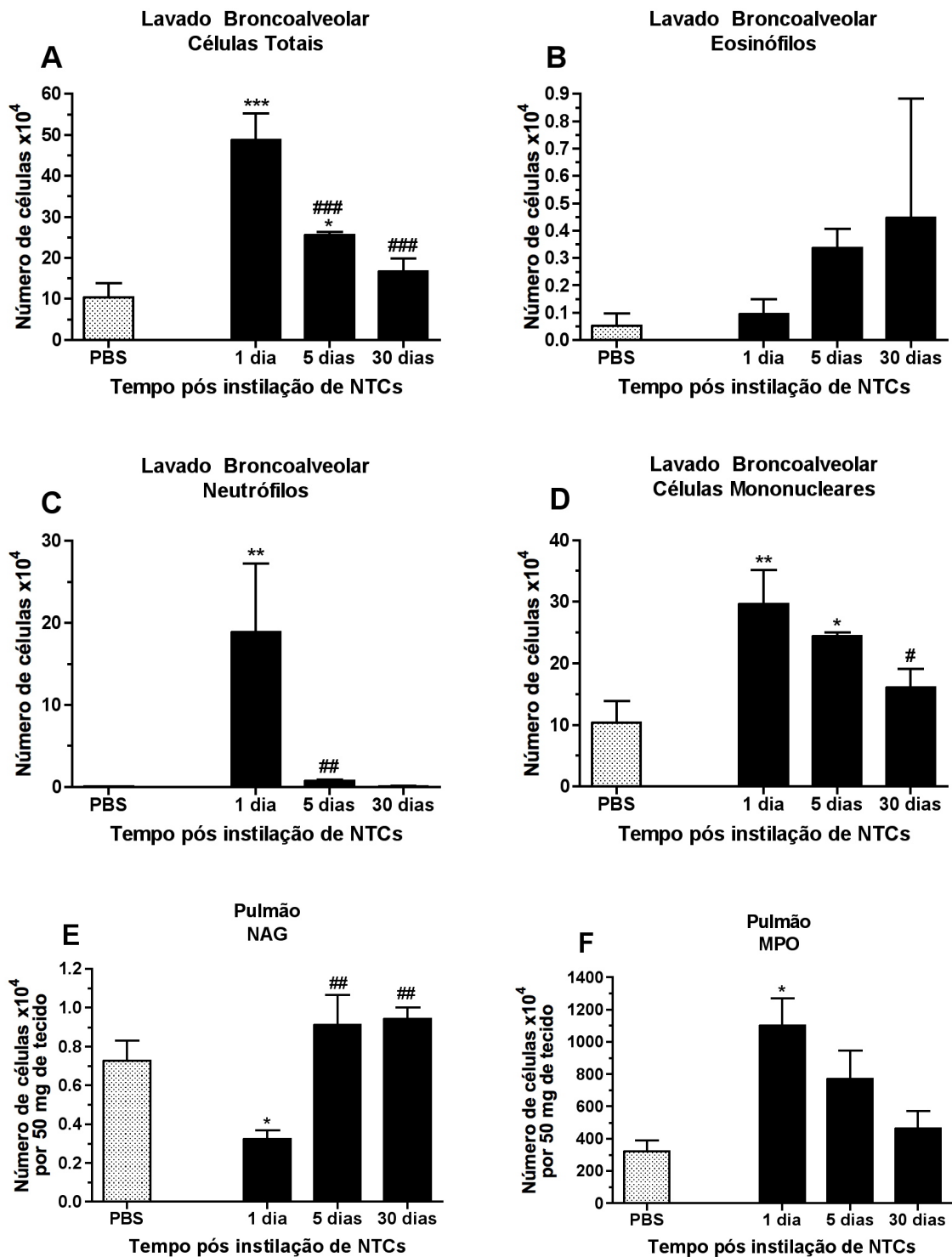
1503 Os resultados mostraram que houve um aumento no número de células totais recolhidos no lavado broncoalveolar no 1º dpi ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle. No 5º dpi, o número de células recolhidas no BAL foi menor que no 1º dpi ( $p < 0,001$ ) mas ainda sim maior que o do grupo PBS ( $p < 0,05$ ). E finalmente, no 30º dpi, o número de células no BAL se iguala ao do grupo PBS (Figura 26a). Não houve diferenças quanto ao número de eosinófilos (Figura 26b).

1509 Para os neutrófilos, vimos o perfil celular é semelhante àquele observado para o composto 1100, com um aumento no 1º dpi ( $p < 0,01$ ), diminuindo no 5º dpi ( $p < 0,01$ ) já se equiparando ao grupo controle e assim se mantendo até o 30º dpi (Figura 26c). Células mononucleares são encontradas aumentadas no 1º dpi ( $p < 0,01$ ), assim continuam até o 5º dpi ( $p < 0,05$ ) quando começam a diminuir até atingirem os níveis basais no 30º dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 26d).

1515 A quantificação de N-acetil-glicosaminidase (NAG) no tecido pulmonar mostrou que também houve uma diminuição do número de macrófagos no parênquima pulmonar no 1º dpi ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais controles (Figura 1518 26e). No 5º dpi, o número de células aumenta voltando aos níveis basais ( $p < 0,01$ ) e no 30º dpi está nos mesmo níveis do grupo controle (Figura 26e).

Já a quantificação de mieloperoxidase (MPO), também no tecido pulmonar, 1521 revelou que no 1º dpi há um aumento no número de neutrófilos ( $p < 0,05$ ), porém este número decresce até o 30º dpi quando o número de neutrófilos no parênquima se iguala ao grupo PBS ( $p < 0,01$ ) (Figura 26f).

1524



1527

**Figura 26: Recrutamento celular causado pela instilação intranasal do composto 3150 é tempo dependente e ocorre de forma semelhante entre as vias aéreas e o parênquima pulmonar.**

1530

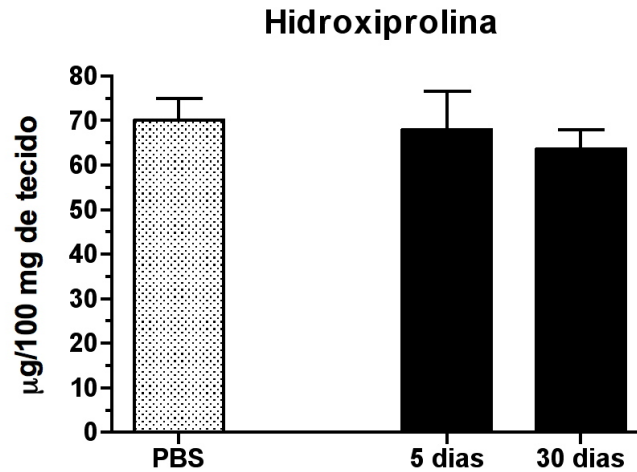
Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn. \*(#)= $p < 0,05$ ; \*\*(##)= $p < 0,01$  e \*\*\*(###)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos em relação ao 1º dia pós instilação.

1533

a) células totais, b) eosinófilos, c) neutrófilos, d) células mononucleares do lavado broncoalveolar, e) NAG do pulmão, f) MPO do pulmão.



1536 A quantificação de hidroxiprolina tecidual mostrou que não houve deposição de colágeno no parênquima pulmonar durante o período de tempo analisado (Figura 27).



1539

**Figura 27: A instilação intranasal do composto 3150 não induz a deposição de colágeno no parênquima pulmonar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls.  $*=p<0,05$ ;  $**=p<0,01$  e  $***=p<0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS.

1542

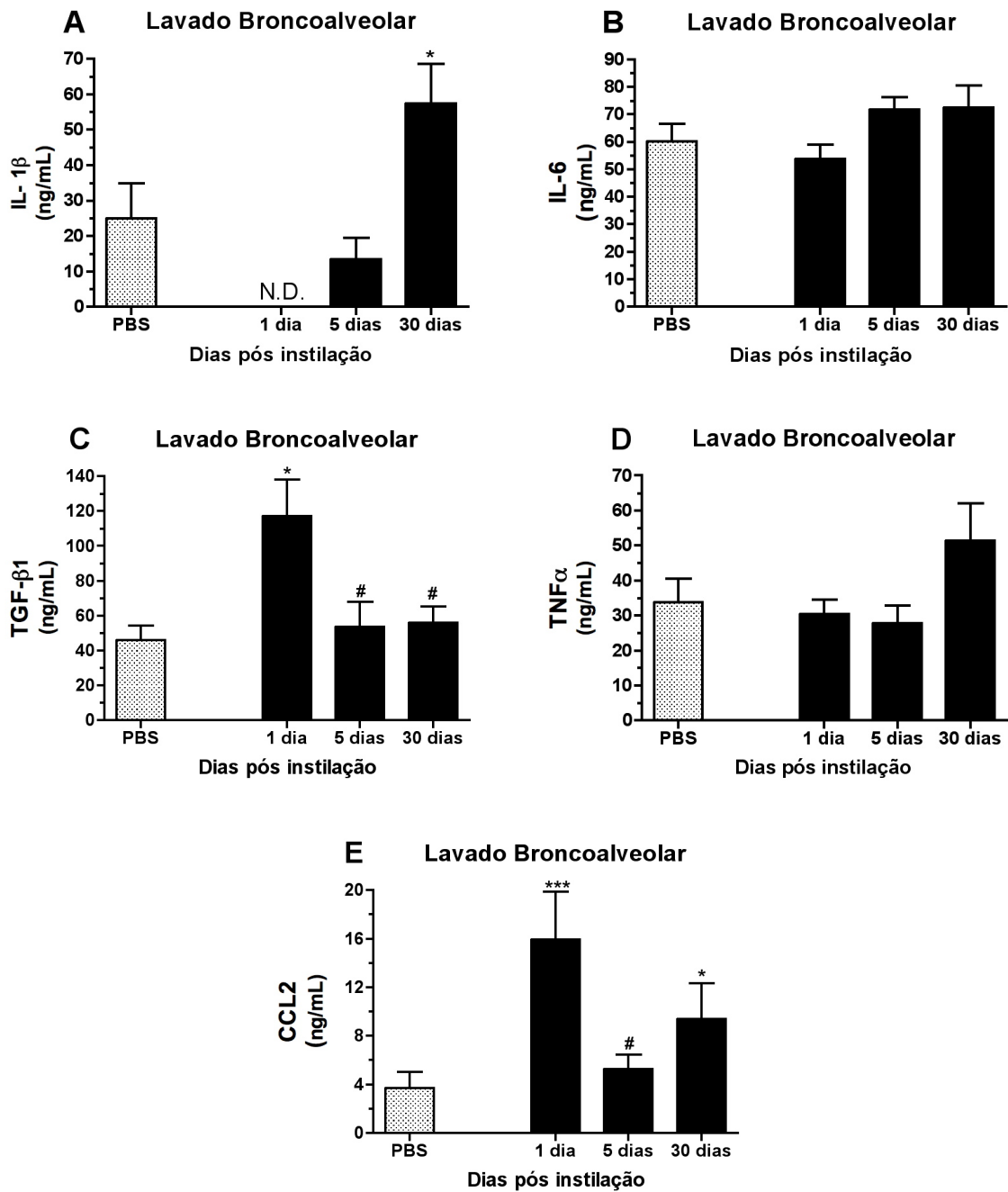
1545 **5.2.2.2 Caracterização do perfil de citocinas e quimiocinas após a instilação**  
1546 **intranasal de nanotubos de carbono *in vivo*.**

No BAL, nossos ensaios falharam em detectar diferenças na produção de  
1548 IL-6 e TNF $\alpha$  (Figura 28b e 28d).

Assim como no composto 1100, IL-1 $\beta$  teve uma produção  
significativamente maior somente no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,01$ ) quando comparado com o grupo  
1551 controle (Figura 28a). TGF- $\beta$ 1 teve uma cinética diferente. No 1<sup>o</sup> dpi apresenta uma  
produção aumentada quando comparado ao grupo PBS mas que diminui aos níveis  
basais já no 5 dpi ( $p < 0,05$ ) e assim se mantém até o 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 28c).

1554 Assim como o composto 1100, no BAL, o composto 3150 induz a produção  
de CCL2 em 2 picos distintos. O primeiro pico, está no 1<sup>o</sup> dpi, quando seus níveis  
estão significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ). No 5<sup>o</sup> dpi sua produção decai aos  
1557 níveis basais ( $p < 0,05$  em relação ao 1<sup>o</sup> dia) e depois volta a subir no 30<sup>o</sup> dpi sendo  
estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) (Figura 28e).

1560



1563

**Figura 28: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 3150 no lavado broncoalveolar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn. \*(#)= $p < 0,05$ ; \*\*(##)= $p < 0,01$  e \*\*\*(###)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos em relação ao 1º dia pós instilação. a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE do lavado broncoalveolar.

1566

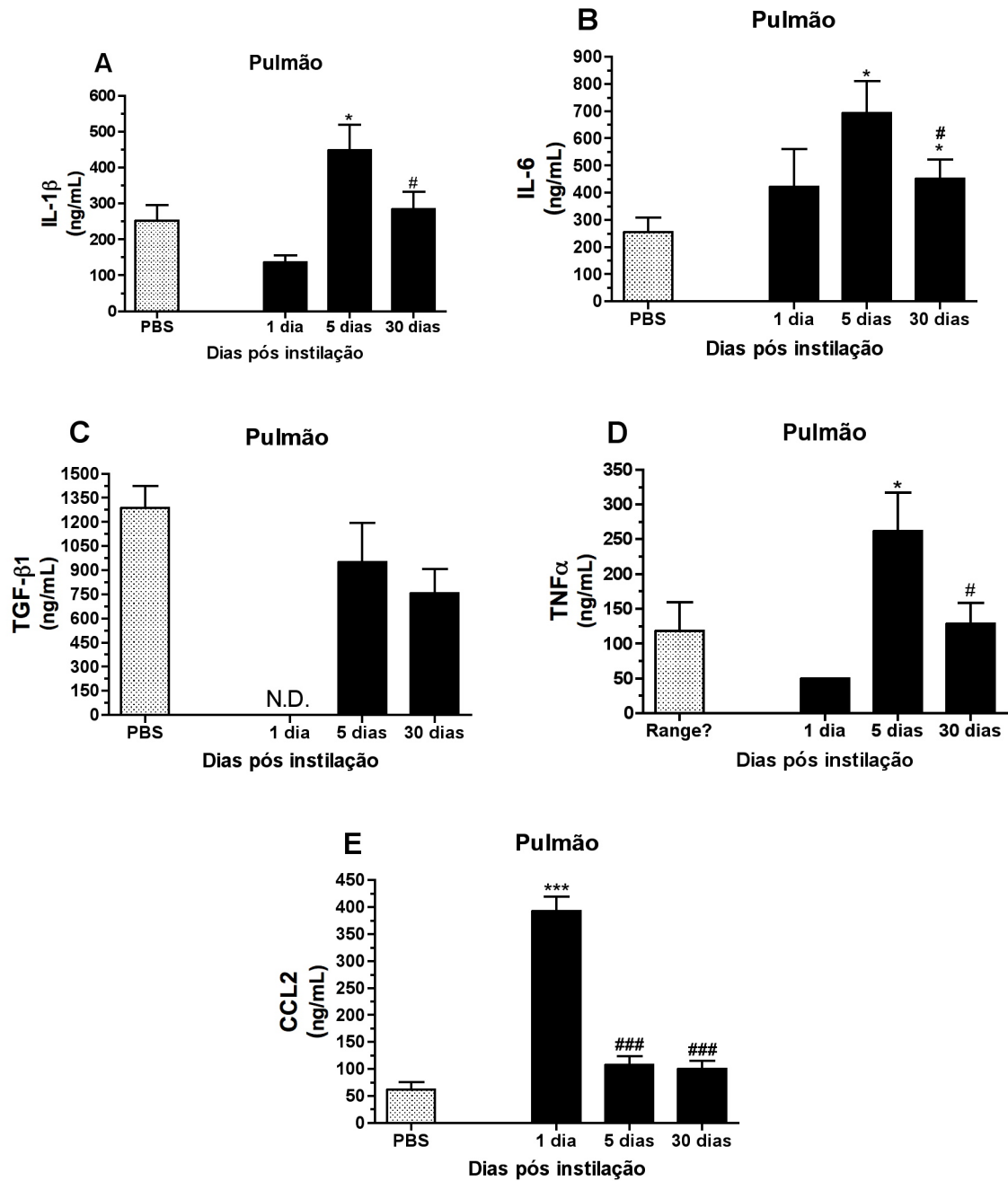
1569

Assim como para o composto 1100, os níveis destas citocinas também foi  
1572 dosado no parênquima pulmonar. IL-1 $\beta$  apresentou um aumento significativo de sua  
produção no 5<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ), retornando aos níveis basais no 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura  
29a). IL-6 possui um pico de produção mais tardio, apresentando-se somente no 5<sup>o</sup>  
1575 dpi ( $p < 0,05$ ), que também regressa aos níveis de produção do grupo PBS no 30<sup>o</sup> dpi  
( $p < 0,05$ ) (Figura 29b).

Nossos ensaios falharam em detectar diferenças na produção de TGF- $\beta$ 1  
1578 ao longo do tempo (Figura 29c). TNF $\alpha$  apresentou uma cinética semelhante àquela  
apresentada pelo composto 1100, na qual temos uma produção desta citocina  
significativamente maior no 5<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) que retorna aos níveis basais no 30<sup>o</sup> dpi  
1581 ( $p < 0,05$ ) (Figura 29d).

No 1<sup>o</sup> dpi, CCL2 teve uma significativa produção ( $p < 0,001$ ) quando  
comparado aos controles, no 5<sup>o</sup> dpi ela baixou para os níveis dos animais que  
1584 receberam PBS ( $p < 0,001$  quando comparado com o dia 1) e, diferentemente do  
composto 1100, sua produção não voltou a subir no 30<sup>o</sup> dpi, permanecendo nos níveis  
basais (Figura 29e).

1587



1590

**Figura 29: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 3150 no parênquima pulmonar.** Valores expressos em média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn. \*(#)= $p < 0,05$ ; \*\*(##)= $p < 0,01$  e \*\*\*(###)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos em relação ao 5º dia pós instilação. a) IL-1β, b) IL-6, c) TGF-β1, d) TNFα, e) CCL2/JE do lavado broncoalveolar.

1593

1596

### 5.3 - 3ª Parte – Resultados *in vivo* com SFB

1599 Os resultados *in vivo* obtidos com o PBS nos deixou surpreso, porque não  
se esperava uma diferença de indução da fibrose pulmonar uma vez que os  
compostos se comportaram de forma muito semelhante, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

1602 Dessa forma foi levantada três hipóteses para tentar explicar essa  
diferença: 1) realmente o composto 3150 não induz fibrose, 2) o estado de  
aglomeração das partículas interfere no modo como a nanopartícula interage como o  
1605 órgão alterando o efeito final e 3) o composto 3150 não induziu fibrose porque a  
quantidade de nanopartículas que atingiu as vias aéreas inferiores foi muito pequena.

A hipótese 2 surgiu a partir de observações empíricas de que o composto  
1608 3150 formava grumos grandes com uma facilidade e rapidez muito maior que o  
composto 1100 quando a sonicação é sessada e a solução movimentada. Estas  
observações também nos levaram a elaborar a 3ª hipótese, uma vez que nos  
1611 experimentos realizados, durante a instilação intranasal notou-se que grande parte do  
material ficava retido no focinho do animal, não atingindo de fato o pulmão.

Com o objetivo de tentar solucionar os problemas levantados nas hipóteses  
1614 2 e 3, foi decidido então procurar por uma solução que dispersaria melhor e de  
maneira mais estável os nanocompostos. Com base nos artigos (SAGER, PORTER  
*et al.*, 2007; PORTER, SRIRAM *et al.*, 2008; WANG, XIA *et al.*, 2010) o meio de  
1617 dispersão escolhido foi o SFB. Isto porque segundo o autor, a albumina e outros  
componentes como fosfolípidos, quando presente na solução, é capaz de estabilizar  
a dispersão dos nanotubos.

#### 1620 5.3.1 - Resultados do composto 1100

##### 5.3.1.1 Efeito da solubilização dos nanotubos de carbono em SFB no infiltrado inflamatório e fibrose pulmonar *in vivo*.

1623 Os resultados indicaram que o SFB sozinho foi capaz de induzir infiltrado  
inflamatório nas vias aéreas no 1º dpi que persistiu até o 5º dpi ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$   
respectivamente) quando, no 30º dpi, diminuiu em relação ao 1º dia ( $p < 0,05$ ) mas  
1626 ainda sim se manteve mais alto que o PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 30a). O influxo celular  
induzido pela administração de SFB é composta basicamente de neutrófilos, que  
estavam em maior número somente no 1º dpi ( $p < 0,05$ ) e de células mononucleares

1629 que, quando comparado com o grupo controle, também estavam significativamente  
aumentado três pontos analisados ( $p < 0,05$  para todos), apesar de no 30° dia, seu  
número ser menor que o do 1° dpi ( $p < 0,05$ ), (Figura 30c e 30d respectivamente). Não  
1632 foi encontrado diferença nos números de eosinófilos (Figura 30b).

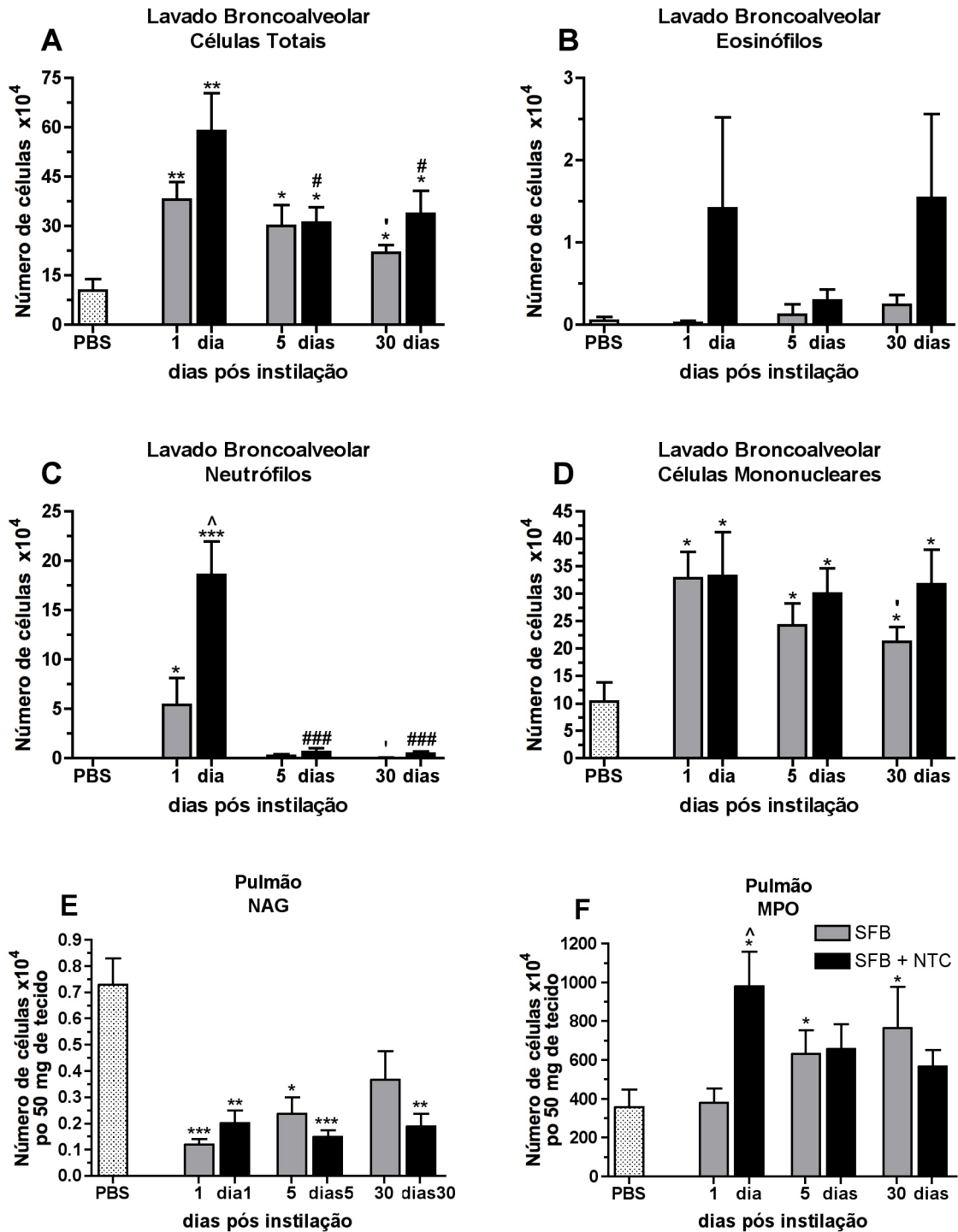
No pulmão, SFB foi capaz de reduzir a quantidade de mononucleares no  
1° e 5° dpi ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente). Essa redução foi diminuindo ao longo  
1635 do tempo até que, no 30° dpi, não havia mais diferença em relação ao grupo PBS  
(Figura 30e). Além disso, SFB sozinho induziu o recrutamento neutrofílico somente  
após o 5° dpi ( $p < 0,05$ ) que se estendeu até o 30° dia ( $p < 0,05$ ) (Figura 30f).

1638 Ao mesmo tempo, a associação NTC+SFB também foi capaz de promover  
recrutamento celular no 1° dpi ( $p < 0,01$ ), porém, de mesma intensidade que o SFB  
sozinho. O número de células no BAL reduziu no 5° dpi ( $p < 0,05$ ) mas ainda sim estava  
1641 maior que o do grupo PBS. No 30° dpi, o número de células no lavado broncoalveolar  
era o mesmo do 5° dia e também maior que o grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 30a)

Os nanotubos solubilizados em SFB também foram capazes de recrutar  
1644 neutrófilos no 1° dpi ( $p < 0,001$ ) porém em um número muito maior que somente o SFB  
( $p < 0,05$ ). Esse recrutamento cessou após o 1° dpi já sendo igual ao grupo controle do  
5° dpi em diante ( $p < 0,01$ ) (Figura 30c). Da mesma forma, o composto 1100 em SFB  
1647 não foi capaz de alterar o número de eosinófilos encontrados no BAL.

No pulmão, o composto 1100 também diminuiu o número de células  
mononucleares nos dois primeiros tempos analisados ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$   
1650 respectivamente). Entretanto, o número de macrófagos após 30 dias da sua instilação  
intranasal ainda estava menor que no grupo PBS ( $p < 0,01$ ) (Figura 30e).  
Diferentemente do SFB, este composto induziu o acúmulo de neutrófilos de forma  
1653 aguda, ou seja, no 1° dpi seu número no parênquima pulmonar era maior que o grupo  
PBS ( $p < 0,01$ ) e o grupo SFB ( $p < 0,05$ ), mas no 5° e 30° dpi seu número já havia  
reduzido e estava igual ao basal (Figura 30f).

1656



1659

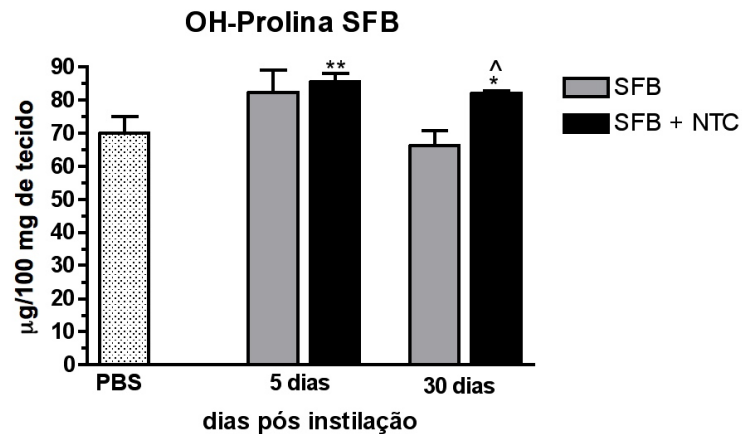
1662 **Figura 30: Recrutamento celular causado pela instilação intranasal do composto 1100 solubilizado em SFB é tempo dependente e ocorre de forma semelhante entre as vias aéreas e o parênquima pulmonar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de Student. \*(#)(<sup>^</sup>)(<sup>'</sup>)=p<0,05; \*\*((##)(<sup>^</sup>)(<sup>'</sup>))=p<0,01 e \*\*\*((###)(<sup>^</sup>)(<sup>'</sup>))=p<0,001. \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS, # para diferenças entre os grupos SFB+NTC em relação ao 1º dia pós instilação, <sup>^</sup> para diferenças entre os grupos SFB+NTC em relação ao seu controle (SFB) de tempo e <sup>'</sup> para diferenças entre os grupos SFB e o 1º d pós instilação. a) células totais, b) eosinófilos, c) neutrófilos, d) células mononucleares do lavado broncoalveolar, e) NAG do pulmão, f) MPO do pulmão.

1665

1668



O ensaio de hidroxiprolina mostrou que, nos animais instilados somente com SFB, não houve deposição de colágeno no parênquima pulmonar em nenhum momento analisado. Em contra partida, nos animais instilados com SFB+NTC, houve deposição de colágeno já no 5º dpi ( $p < 0,01$ ) e que a quantidade de colágeno depositada no tecido se manteve até o 30º dpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 31).



1674

**Figura 31: A deposição de colágeno induzida pela instilação intranasal do composto 1100 solubilizado em SFB ocorre já no 5º dpi.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls e Teste t de Student.  $*(^{\wedge})=p < 0,05$ ;  $**(^{\wedge\wedge})=p < 0,01$  e  $***(^{\wedge\wedge\wedge})=p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e ^ para diferenças entre os grupos SFB+NTC em relação ao seu controle (SFB) de tempo.

1680

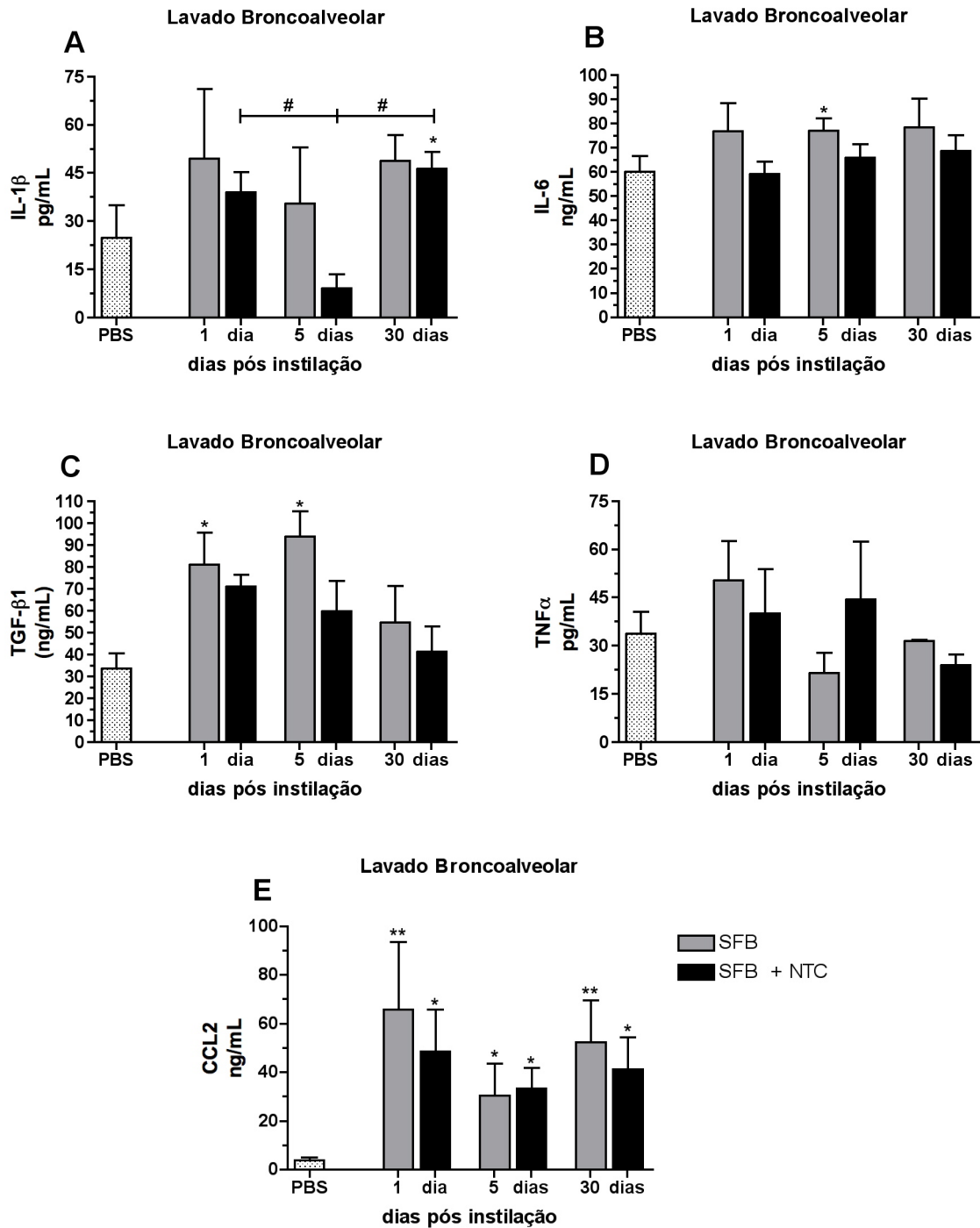
### 5.3.1.2 Efeito da solubilização dos nanotubos de carbono em SFB no perfil da produção de citocinas *in vivo*.

1683 Ao dosar a produção de citocinas no BAL, nossos ensaios falharam  
completamente em detectar diferenças para TNF $\alpha$  tanto para a administração de SFB  
quanto para a de NTC (Figuras 32a, 32b e 32d) e pouco conclusivos para IL-1 $\beta$ , IL-6.

1686 Para IL-1 $\beta$ , os resultados demonstraram que a instilação intranasal de  
NTCs causa uma produção significativa dessa citocina só no 30<sup>o</sup> dpi (Figura 32a). Já  
para IL-6, vimos que esta citocina tem uma produção aumentada somente no 5<sup>o</sup> dpi  
1689 (Figura 32b).

A instilação intranasal de somente SFB foi capaz de induzir  
significativamente a produção de TGF- $\beta$ 1 nos dias 1 e 5 ( $p < 0,05$  para ambos os  
1692 tempos) e no 30<sup>o</sup> dpi a produção desta citocina estava igual ao do grupo PBS. Ao  
mesmo tempo, a instilação intranasal de NTCs não alterou a produção desta citocina,  
apesar do aumento da média, esta não foi estatisticamente diferente ( $p = 0,0876$ )  
1695 (Figura 32c).

No BAL, nossos resultados demonstraram que CCL2 teve uma cinética  
diferente das outras citocinas. Os animais instilados com SFB tiveram um aumento  
1698 significativo de sua produção no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,01$ ), no 5<sup>o</sup> dpi sua produção parece  
diminuir em relação ao primeiro dia, mas continua mais alta que o grupo PBS ( $p < 0,05$ )  
e então, no 30<sup>o</sup> dpi, volta a se elevar ( $p < 0,01$ ). Os animais que foram instilados com  
1701 NTCs também tiveram um perfil de produção constante. Nesses animais, a produção  
de CCL2 é significativamente maior no 1<sup>o</sup> dpi e assim ela se mantém até o final do  
experimento, sem aumentar nem diminuir ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$  para os tempos  
1704 de 1, 5 e 30 dpi, respectivamente) (Figura 32e).



1707

**Figura 32: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 1100 solubilizado em SFB no lavado broncoalveolar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de Student. \* (#)= $p < 0,05$ ; \*\* (##)= $p < 0,01$  e \*\*\* (###)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS e # para diferenças entre os grupos SFB+NTC. a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE do lavado broncoalveolar.

1710

1713

1716 Estas citocinas foram dosadas novamente no tecido pulmonar.

SFB sozinho foi capaz de induzir a produção significativa de IL-1 $\beta$  somente no 1 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,05$ ), sua produção então decaiu até o 30 $^{\circ}$  dpi onde ela estava semelhante ao PBS. Já a instilação intranasal de NTC prolongou esse efeito, uma vez que a produção de IL-1 $\beta$  foi estatisticamente maior no 1 $^{\circ}$  e também no 5 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente). Assim como no SFB, ao 30 $^{\circ}$  dpi, a produção de IL-1 $\beta$  estava menor que quando comparado ao 1 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,05$ ) e igual aos animais instilados com PBS (Figura 33a).

Nossos resultados também mostraram que IL-6 teve uma produção bem marcante. Sua produção estava aumentada nos dias 1 pós instilação ( $p < 0,001$ ), quando no dia 5 a produção aumentou ainda mais ( $p < 0,001$  em relação ao PBS e  $p < 0,05$  em relação ao dia 1) e então, no 30 $^{\circ}$  dpi ela diminui em relação ao 5 $^{\circ}$  dia ( $p < 0,01$ ) mas ainda sim continua mais alta que o PBS ( $p < 0,01$ ). Os NTC também induzem a produção de IL-6 nos três dias analisados ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente), porém de uma forma constante, sem um pico claro. Além do mais, sua indução no 5 $^{\circ}$  dpi, foi estatisticamente menor que nos animais instilados com SFB ( $p < 0,05$ ) (Figura 33b).

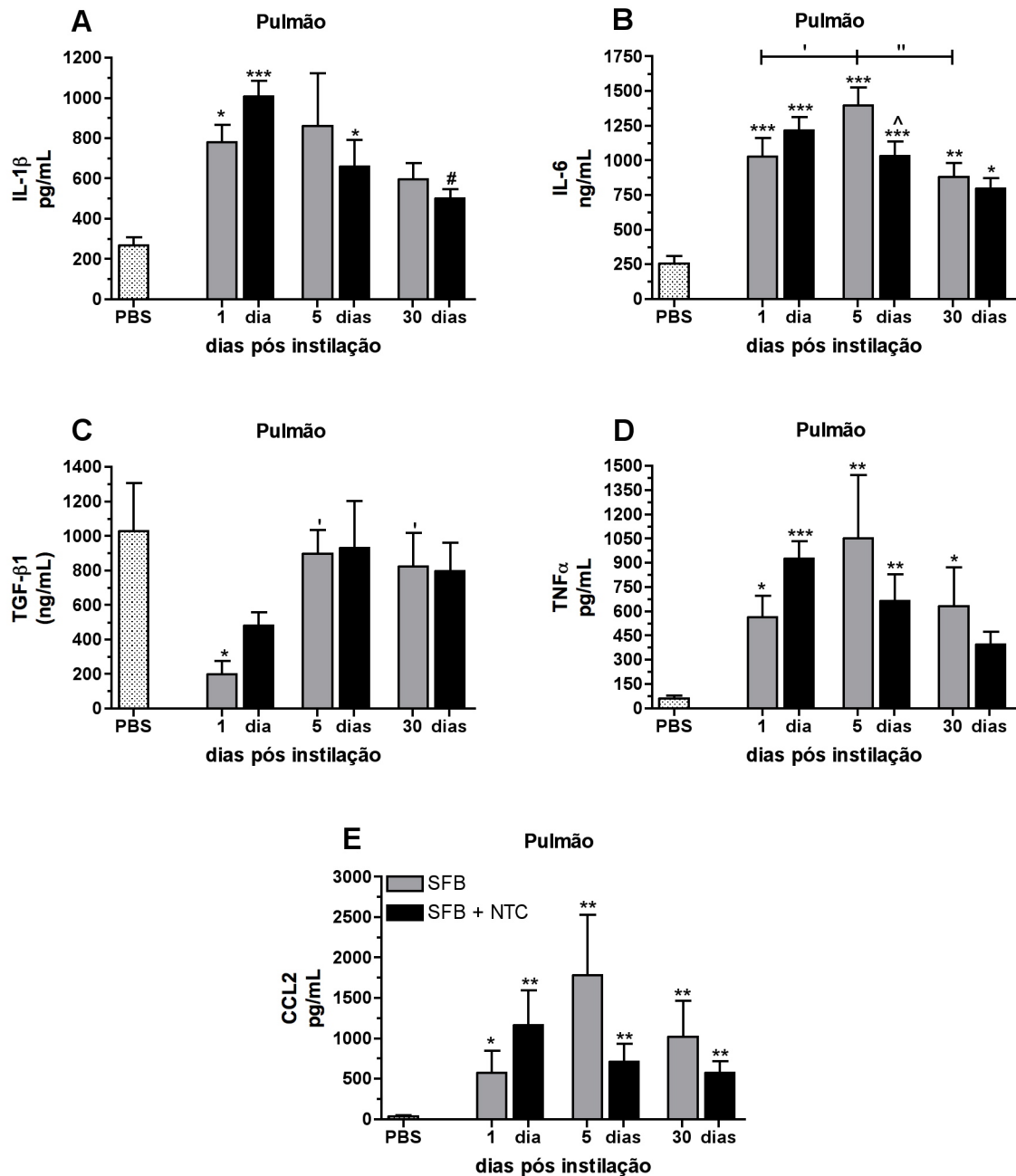
Os testes estatísticos acusaram diferenças significativas na produção de TGF- $\beta$ 1 somente para os animais instilados com SFB. Neste caso, quando comparado com o grupo controle, a instilação intranasal causou uma redução na produção desta citocina no 1 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,05$ ) com um retorno aos níveis basais de produção nos dias 5 e 30 pós instilação ( $p < 0,05$  para ambos quando comparado com o 1 $^{\circ}$  dpi). A instilação intranasal com NTC causou um efeito semelhante, porém, as diferenças não foram significativas (Figura 33c).

TNF $\alpha$  teve uma cinética muito semelhante à da IL-6. Quando comparado ao grupo PBS, a instilação intranasal com SFB induziu o aumento de sua produção nos três analisados ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente). Já a instilação intranasal com NTC foi capaz de induzir uma produção significativa desta citocina somente no 1 $^{\circ}$  e 5 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente). No 30 $^{\circ}$  dpi, sua produção estava igual a dos animais que receberam PBS (Figura 33d).

CCL2 apresentou uma cinética inversa da observada no BAL. No tecido pulmonar, a instilação intranasal de SFB causou o aumento de sua produção no 1 $^{\circ}$

1749 dpi ( $p < 0,05$ ), entretanto, no 5º dpi, seus níveis parecem aumentar ainda mais em  
relação ao dia 1, quando, finalmente, no 30º dpi sua produção parece cair para os  
níveis encontrado no 1º dpi. Já a instilação intranasal de NTCs causou um efeito muito  
parecido. Eles também induziram a produção de CCL2 nos três tempos analisados  
1752 ( $p < 0,01$  para os três tempos), porém, sua produção não aumentou do 1º para o 5º dia.  
Além disso, sua produção também foi menor que a induzida por SFB no 5º dia (Figura  
33e).

1755



1758

**Figura 33: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 1100 solubilizado em SFB no parênquima pulmonar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de Student. \*(')(^)= $p < 0,05$ ; \*\*('')(^^)= $p < 0,01$  e \*\*\*('')(^^^)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS, ^ para diferenças entre os grupos SFB+NTC em relação ao seu controle de tempo (SFB) e ' para diferenças entre os grupos SFB e o 1º d pós instilação. a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE no parênquima pulmonar.

1761

1764

## 1767 5.3.2 - Resultados do composto 3150

### 5.3.2.1 Efeito da solubilização dos nanotubos de carbono em SFB no infiltrado inflamatório e na fibrose pulmonar *in vivo*.

1770 Finalmente avaliamos o efeito que a solubilização dos NTCs em SFB causa nas suas características inflamatórias.

1773 Como visto antes, SFB é capaz de induzir influxo celular para as vias aéreas provocando inflamação e seu efeito sobre as células totais no BAL, parênquima, produção de citocinas e deposição de colágeno foram descritas no item 5.3.1 e, apesar de também estar representado nos gráficos seguintes, a descrição  
1776 não será repetida.

O composto 3150, assim como o 1100, foi capaz de induzir transmigração celular para o espaço aéreo pulmonar no 1º dia ( $p < 0,05$ ). Entretanto, diferentemente  
1779 do composto 1100, o número de células coletado no BAL não caiu no 5º e 30º dpi ( $p < 0,05$  para ambos) (Figura 34a e 34c).

Sobre o recrutamento de eosinófilos, os nanotubos de carbono tiveram um  
1782 efeito interessante. Parece que ele foi capaz de induzir o recrutamento dessas células, pois o teste estatístico ANOVA foi capaz de detectar diferenças entre os grupos ( $p = 0,0146$ ), todavia, o pós teste de Dunn não foi capaz de identificar entre quais  
1785 grupos havia diferença (Figura 34b). Provavelmente isto ocorreu devido a dispersão das amostras e a natureza do teste. As amostras não se comportam de forma normal (Gaussiana), o que nos obriga a realizar um teste não paramétrico no caso, o pós  
1788 teste de Dunn. Devido a isso acreditamos que as diferenças não foram detectadas pelo fato desse teste estatístico ser naturalmente mesmo robusto quando comparado com um paramétrico (Newman-Keuls ou Bonferroni por exemplo).

1791 As células mononucleares apresentaram-se aumentadas no 1º e 5º dpi ( $p < 0,01$  para ambos) quando comparado ao grupo controle e no 30º dia pós instilação elas se encontravam no mesmo nível do grupo controle (Figura 34d). No 30º dia,  
1794 apesar da média ser bem mais elevada que o valor dos controles, não foi detectado diferença estatística, o que não nos permite afirmar se o número de células encontrado no BAL é maior ou igual ao controle PBS.

1797                    No parênquima pulmonar, o composto 3150 teve o mesmo efeito sobre os  
macrófagos que o observado para o composto 1100. A instilação intranasal dos  
1800 nanotubos causou uma queda que se manteve constante no número de macrófagos  
que estavam no tecido pulmonar nos 3 tempos analisados ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$   
respectivamente) (Figura 34e).

                          O número de neutrófilos no parênquima pulmonar encontra-se  
1803 significativamente aumentado já no 1<sup>o</sup> dpi, assim como no composto 1100, entretanto,  
ao invés do seu número cair no 5<sup>o</sup> dpi, sua contagem permanece alta ( $p < 0,05$ ) e sofre  
uma diminuição somente no 30<sup>o</sup> dpi, quando finalmente retorna aos níveis basais  
1806 (Figura 34f).





### 5.3.2.2 Efeito da solubilização dos nanotubos de carbono no perfil de produção de citocinas *in vivo*.

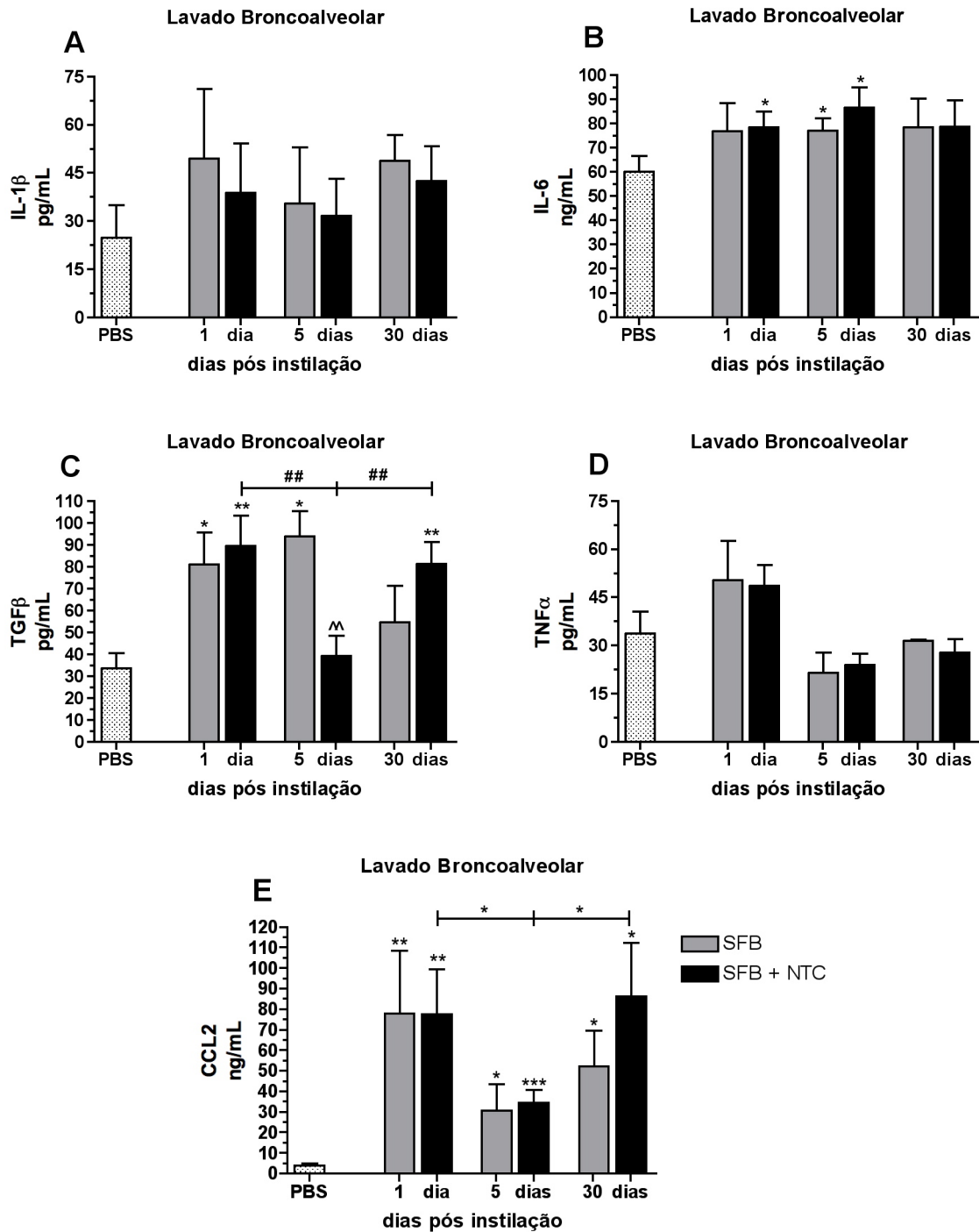
1821                   Analisando o perfil de produção de citocinas, vimos que no BAL não houve  
diferenças estatísticas para IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (Figuras 35a e 35d).

1824                   O composto 3150 foi capaz de induzir IL-6 nos dias 1 e 5 pós instilação  
( $p < 0,05$  para ambos os tempos). No 30 $^{\circ}$  dia, entretanto, sua produção retornou aos  
níveis basais (Figura 35b).

1827                   TGF- $\beta$ 1 teve um cinética bem marcante. Sua produção esteve  
significativamente aumentada no 1 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,01$ ), caiu drasticamente aos níveis basais  
no 5 $^{\circ}$  dia ( $p < 0,01$ ) e no 30 $^{\circ}$  dpi voltou a estar com a sua produção aumentada  
estatisticamente maior que o grupo controle ( $p < 0,01$  em relação ao PBS e ao 50 dpi)  
1830 (Figura 35c)

1833                   Neste caso, a cinética de produção da quimiocina CCL2 foi praticamente  
idêntica à do SFB. Os animais instilados com NTC tiveram um aumento significativo  
de sua produção no 1 $^{\circ}$  dpi ( $p < 0,01$ ), no 5 $^{\circ}$  dpi sua produção diminui em relação ao  
primeiro dia ( $p < 0,05$ ), mas continua mais elevada em relação ao grupo PBS ( $p < 0,05$ )  
e então, no 30 $^{\circ}$  dpi, volta a se elevar ( $p < 0,05$  em relação ao 1 $^{\circ}$  e 5 $^{\circ}$  dias) (Figura 35e).

1836



1839

**Figura 35: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto 3150 solubilizado em SFB no lavado broncoalveolar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de Student. \* (#)( $\wedge$ )= $p < 0,05$ ; \*\* (##)( $\wedge$ )= $p < 0,01$  e \*\*\* (###)( $\wedge$ )= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS, # para diferenças entre os grupos instilados com NTC e  $\wedge$  para diferenças entre os grupos NTC e seu controle de tempo SFB. a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE do lavado broncoalveolar.

1842

1845

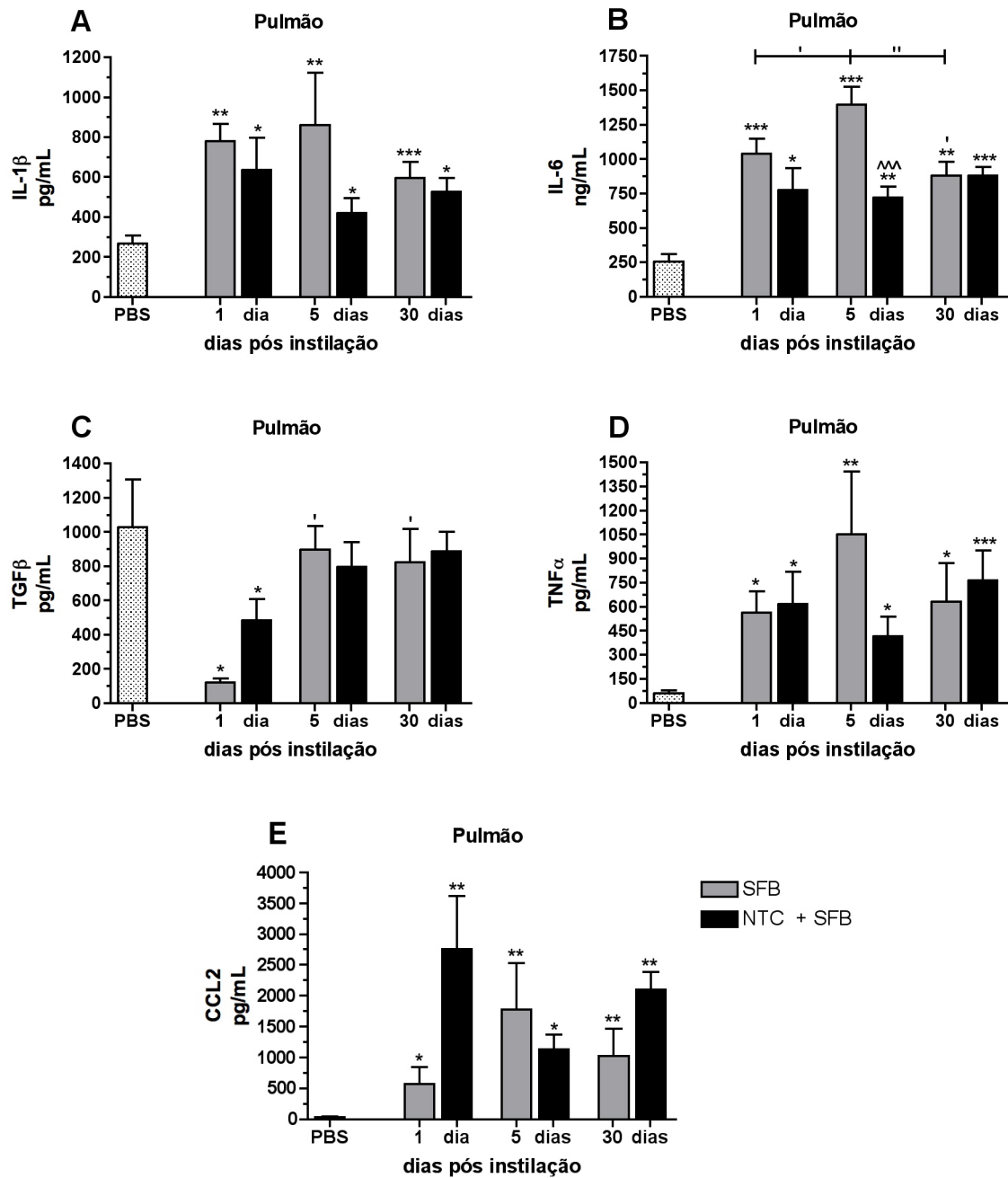
1848                   Analisando os dados de produção das citocinas no parênquima pulmonar, percebemos que os NTCs tiveram um efeito bem mais pronunciado nesta parte do órgão. Aqui, observamos diferenças em todas as citocinas analisadas.

1851                   Nossos resultados indicaram que IL-1 $\beta$  teve uma produção no parênquima pulmonar aguda, já que no 1<sup>o</sup> dpi os níveis desta citocina eram significativamente mais altos ( $p < 0,05$ ). A produção desta citocina se manteve elevada durante todo o curso da instilação (5<sup>o</sup> dia  $p < 0,05$  e 30<sup>o</sup> dia  $p < 0,05$ ) (Figura 36a). IL-6 teve uma produção aumentada no já no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) e dessa forma se manteve do 5<sup>o</sup> até o 30<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,01$  e  $0,001$  respectivamente) (Figura 36b).

1857                   O composto 3150 causou um efeito na produção de TGF- $\beta$ 1 bem semelhante ao composto 1100 em SFB. Neste caso, os testes estatísticos também acusaram diferença significativa na sua produção para os animais instilados com NTC, da mesma forma que para o SFB. Quando comparado com o grupo controle, a instilação intranasal de NTCs causou uma redução na produção desta citocina no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,05$ ) com um retorno aos níveis basais de produção nos dias 5 e 30 pós instilação (Figura 336c).

1866                   Assim como IL-6, TNF $\alpha$  esteve com sua produção aumentada e de forma constante em todos os três pontos analisados do parênquima pulmonar ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  para os dias 1, 5 e 30 respectivamente) (Figura 36d).

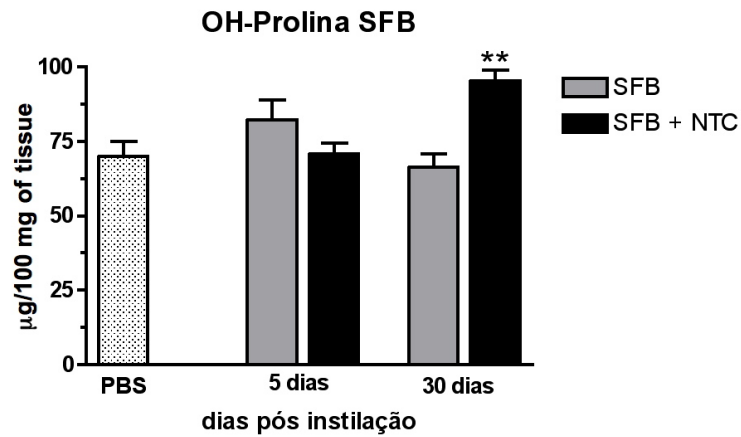
1869                   A cinética de produção de CCL2 no animais instilados com o composto 3150 foi praticamente o inverso do que ocorreu nos animais instilados com SFB. No caso dos NTC, a instilação intranasal causou um significativo aumento na produção da citocina no 1<sup>o</sup> dpi ( $p < 0,01$ ). No 5<sup>o</sup> dpi, sua produção parece diminuir em relação ao 1<sup>o</sup> dia, mas ainda sim continua mais alta que a dos animais que receberam PBS ( $p < 0,05$ ). Finalmente, no 30<sup>o</sup> dpi, sua produção de fato aumenta em relação ao 5<sup>o</sup> dia ( $p < 0,05$ ), voltando aos níveis similares do 1<sup>o</sup> dia (Figura 36e).



1875

1878 **Figura 36: Produção de citocinas e quimiocinas induzida pela instilação intranasal do composto**  
**1100 solubilizado em SFB no parênquima pulmonar.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way  
 ANOVA com pós teste de Newman-Keuls ou Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de  
 1881 Student. \*(')(^)= $p < 0,05$ ; \*\*('')(^^)= $p < 0,01$  e \*\*\*('')(^^^)= $p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em  
 relação ao PBS, ' para diferenças entre os grupos SFB em relação ao 1º dia pós instilação e ^ para  
 1884 diferenças entre os grupos SFB+NTC em relação ao seu controle de tempo (SFB). a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c)  
 TGF- $\beta$ 1, d) TNF $\alpha$ , e) CCL2/JE e f) CCL1-3/KC no parênquima pulmonar.

O ensaio de hidroxiprolina mostrou que, nos animais instilados somente com SFB, novamente não houve deposição de colágeno no parênquima pulmonar em nenhum momento analisado. Em contra partida, nos animais instilados com SFB+NTC, houve deposição de colágeno somente em um momento mais tardio, no 30° dpi ( $p < 0,01$ ) (Figura 37).

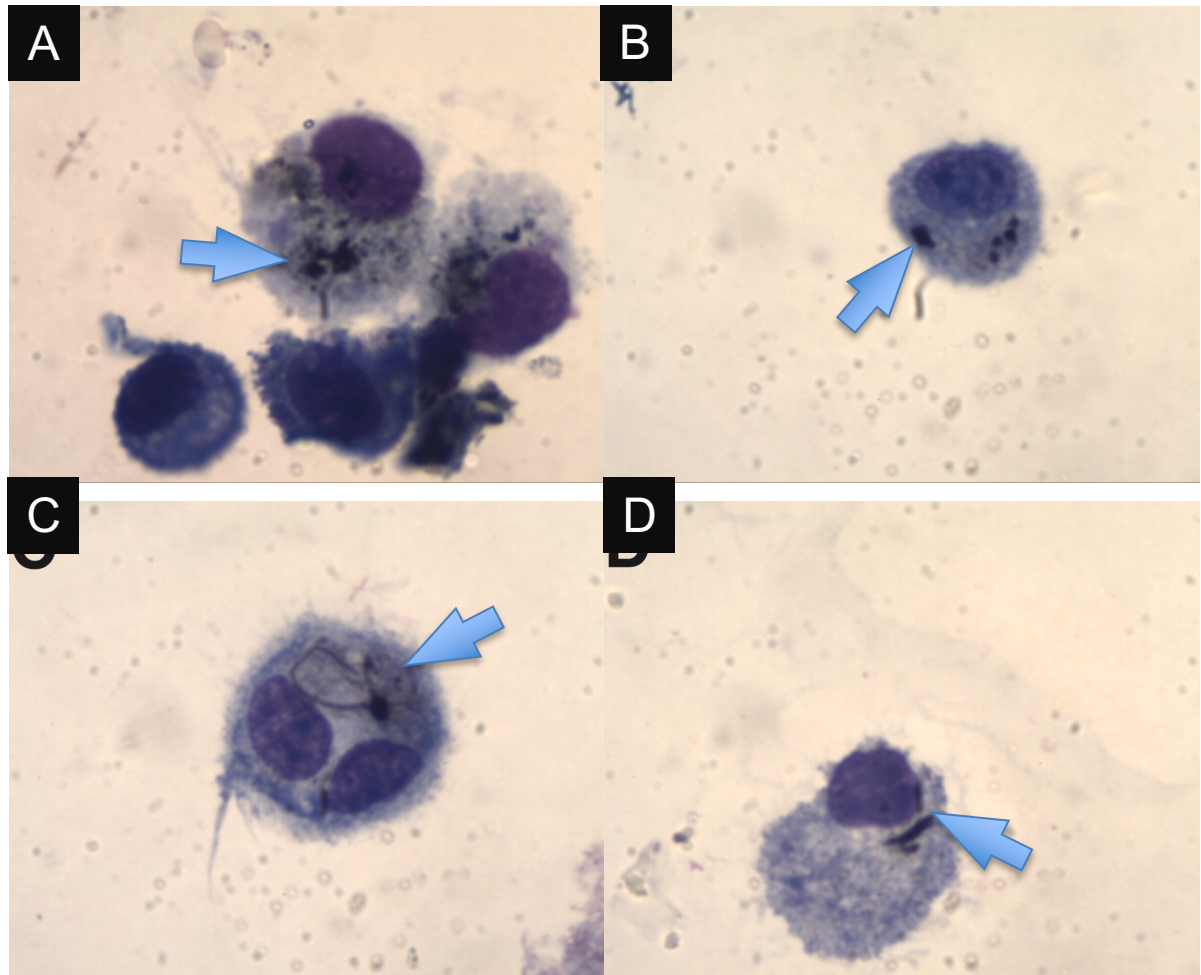


**Figura 37: A deposição de colágeno induzida pela instilação intranasal do composto 1100 solubilizado em SFB ocorre somente no 30° dpi.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls e Teste t de Student.  $*=p < 0,05$ ;  $**=p < 0,01$  e  $***=p < 0,001$ . \* para diferenças entre os grupos em relação ao PBS.

1896

### 5.3.3 - Avaliação citológica e histopatológica

1899 A análise dos citospins feitos do BAL e das lâminas histológicas feitas do  
tecido pulmonar mostraram manchas escuras até mesmo 30 dias após a única  
instilação intranasal de nanotubos de carbono nas vias aéreas (Figura 38).



1902

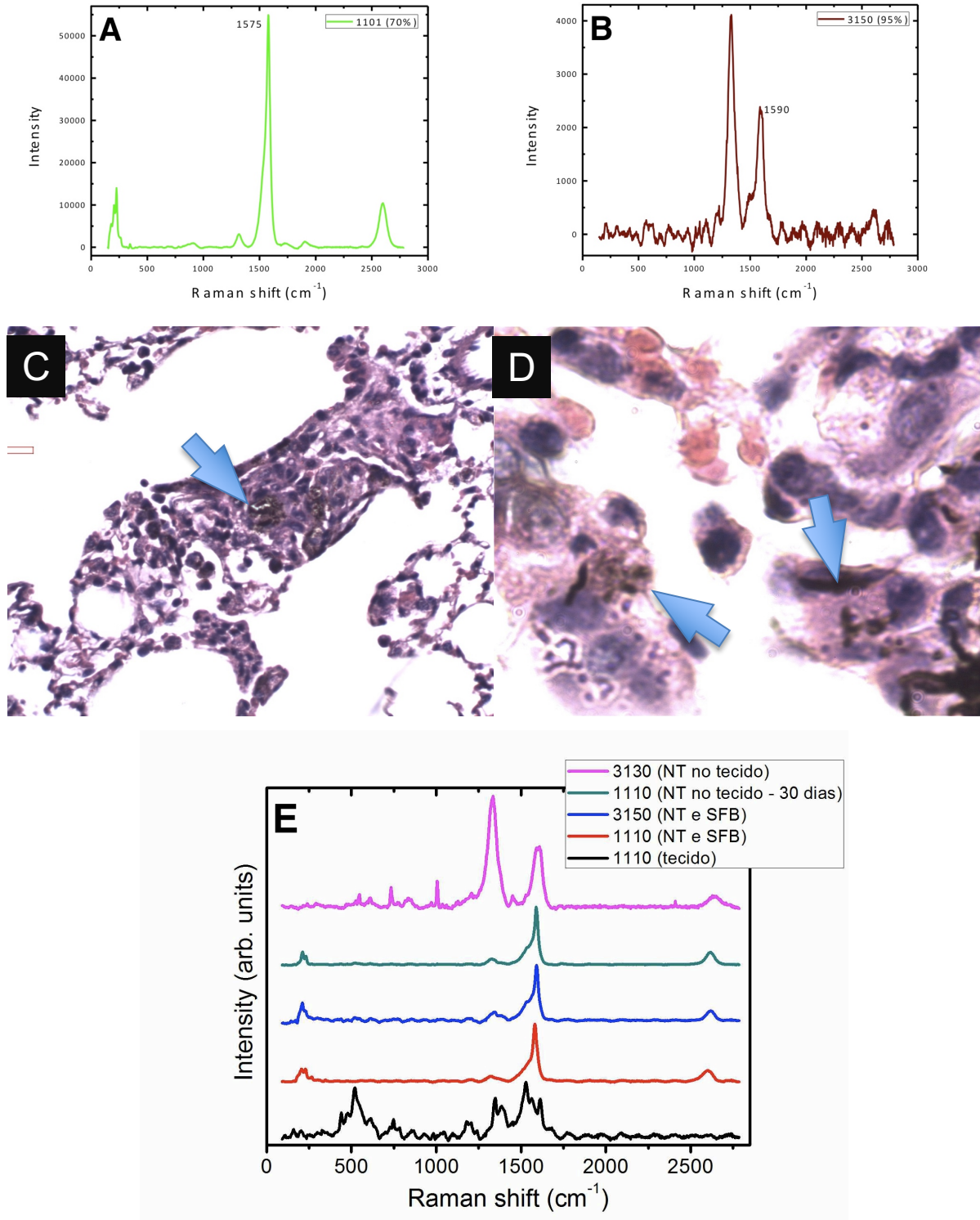
**Figura 38: Micrografias do BAL demonstrando a presença de NTCs associados aos leucócitos presentes nas vias aéreas.** a) 1100 em PBS 5° dpi (100x), b) 1100 em PBS 30° dpi (100x), c) 3150 em PBS 5° dpi (100x) E d) 3150 em PBS 30° dpi (100x). Setas azuis indicam os aglomerados de NTCs

1905

Entretanto, não havia indícios de que estes artefatos escuros eram de fato nanotubos. A espectroscopia Raman foi então realizada com os NTCs puros para se saber o espectro esperado e depois nas amostras para a confirmação da hipótese (Figura 39). O resultado obtido foi que os corpos escuros que foram observados tanto no citospin do BAL quanto nas lâminas histológicas eram, de fato, nanotubos de carbono.

1908

1911



1914

1917

**Figura 39: Espectroscopia Raman dos nanotubos 1100 e 3150.** a) composto 1100 puro, b) composto 3150 puro, c) composto 1100 no tecido (10x), d) composto 3150 no tecido (100x) e e) espectro Raman dos nanocompostos no tecido. Setas azuis indicam os aglomerados de NTCs.



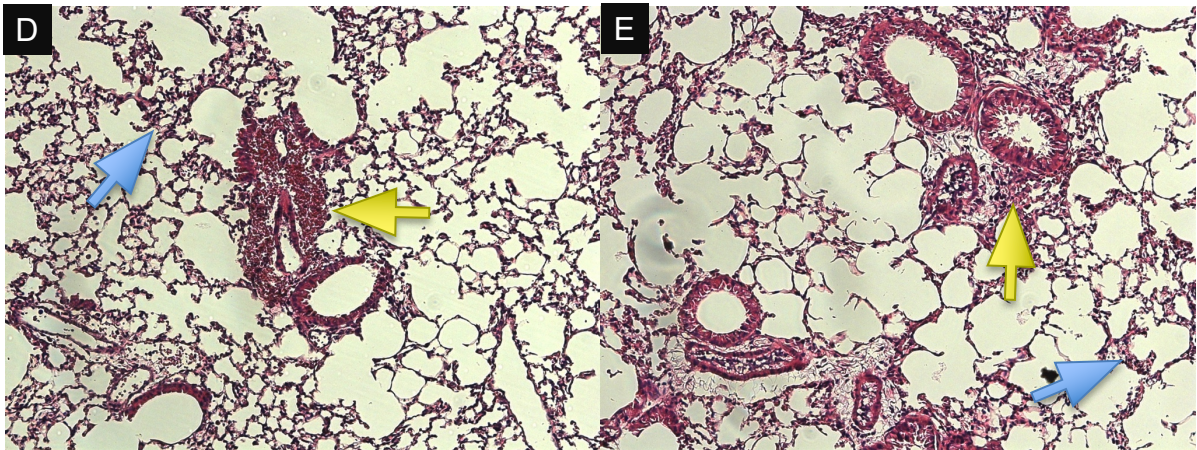
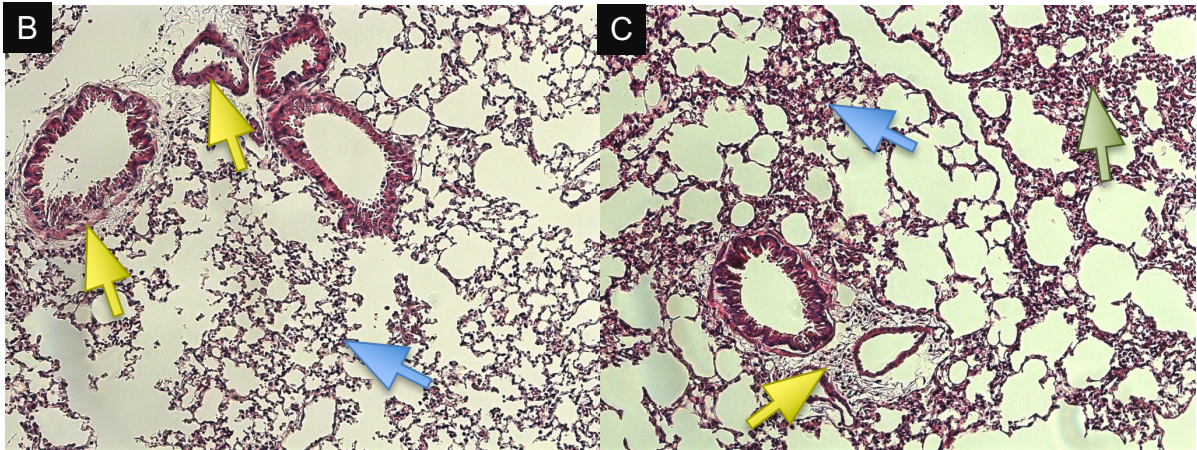
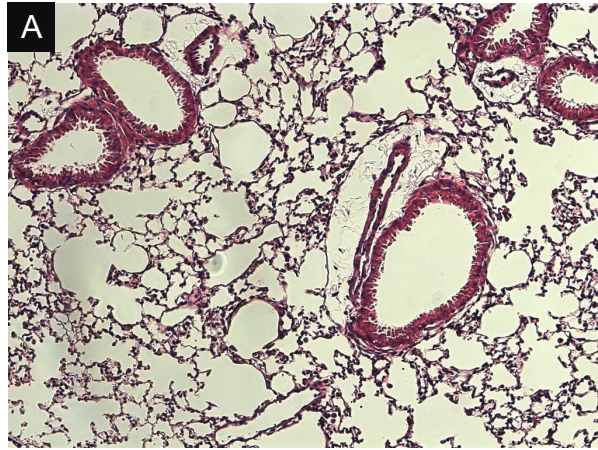
1920                    Desta forma, nossos resultados demonstram que mesmo após uma única instilada de NTC, estes podem persistir por longos períodos de tempo nas vias aéreas presentes em leucócitos e no parênquima pulmonar.

1923                    Analisando as lâminas, vimos que o pulmão dos animais instilados com PBS, portanto, saudáveis, possuem uma arquitetura bem conservada, sem focos de inflamação e espessamento alveolar e com uma região subpleural bem conservada (Figura 40a e 37a).

1926                    Quando analisamos os cortes histológicos dos animais instilados com o composto 1100, vimos que 5 dias depois da instilação intranasal é possível observar regiões multifocais de espessamento do parênquima pulmonar caracterizada por edema, focos de infiltração peribronquiolar e perivascular de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Figura 40b) e que a região subpleural se encontrava levemente espessada (Figura 41b). Aos 30 dias depois da instilação intranasal, observa-se que apareceram focos de hemorragia, com focos inflamatórios crônicos mais extensos e que as regiões onde antes havia um leve espessamento do parênquima (Figura 40c), inclusive na área subpleural, agora estão bem mais espessas e densas, sugerindo até mesmo um processo inicial de fibroplasia (Figura 41c).

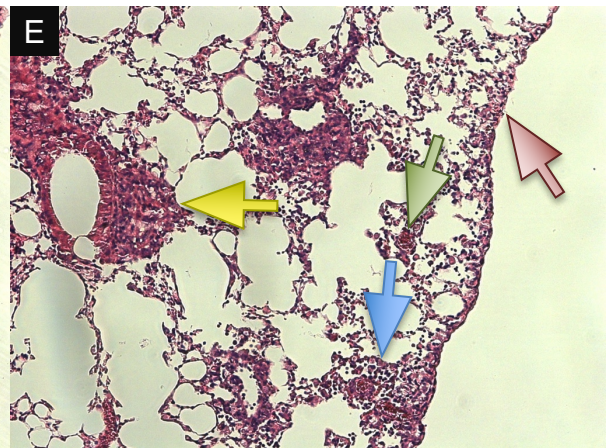
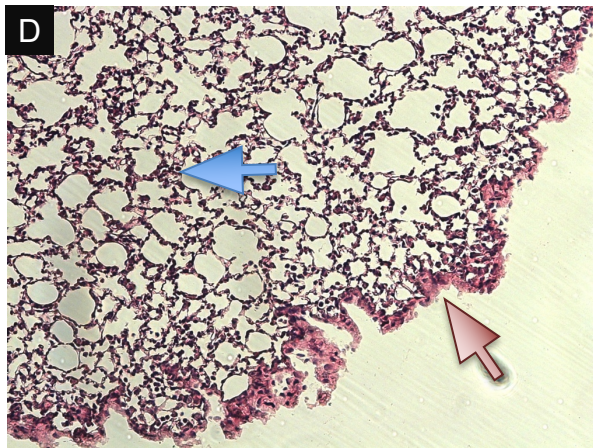
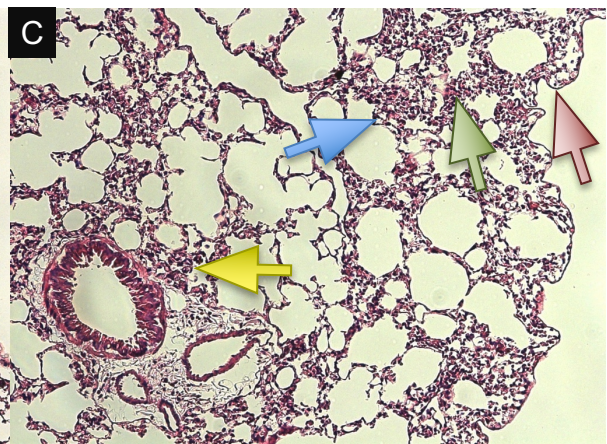
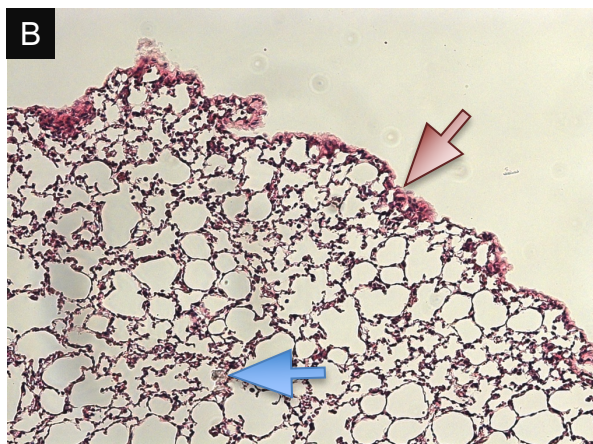
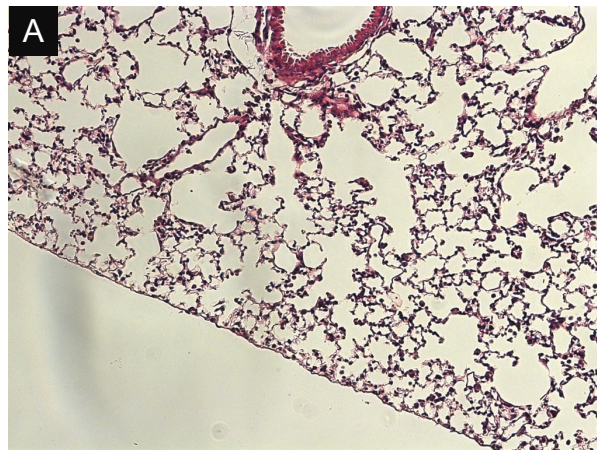
1932                    Em contrapartida, os animais instilados com o composto 3150, 5 dias pós instilação, também apresentaram focos de inflamação peribronquial e perivascular, porém apresentaram espessamento do parênquima muito menor (Figura 40d), exceto na região subpleural, onde as lesões foram similares (Figura 41d). 30 dias após a instilação, nota-se que os focos de inflamação se apresentam mais densos, mas que o edema difuso no parênquima regride bastante, se contendo basicamente nas regiões próximas aos focos inflamatórios (Figura 40e). Há bem menos focos hemorrágicos devido à menor extensão das lesões individuais e o espaço subpleural é bastante acometido (Figura 41e).

1947



1950 **Figura 40: Fotomicrografia das secções do pulmão.** Coloração Hematoxilina e Eosina. Letras a) PBS, b) 1100 5 dpi, c) 1100 30 dpi, d) 3150 5 dpi e e) 3150 30 dpi. Fotomicrografias de a-e: aumento 10x. Seta azul: edema, seta amarela: inflamação peribronquial e perivascular, seta verde: focos de hemorragia.

1953



1956

1959

1962

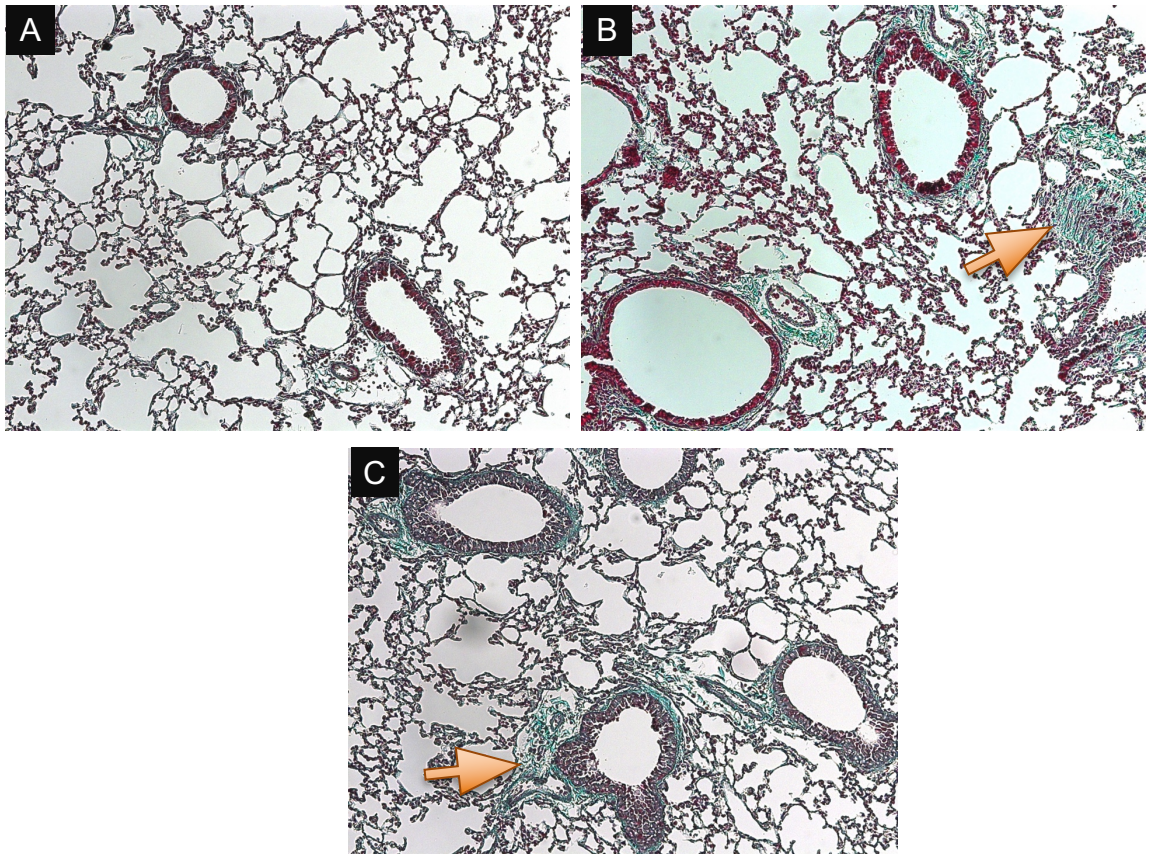
**Figura 41: Fotomicrografias das secções do pulmão, região subpleural.** Coloração Hematoxilina e Eosina. Letras a) PBS, b) 1100 5 dpi, c) 1100 30 dpi, d) 3150 5 dpi e e) 3150 30 dpi. Fotomicrografias de a-e: aumento 10x. Seta azul: edema, seta amarela: inflamação peribronquial e perivascular, seta verde: focos de hemorragia e seta vermelha: inflamação subpleural.

1965 Analisamos as lâminas também com a coloração de Tricrômico de Gomori para avaliar a distribuição da deposição de colágeno no parênquima pulmonar. Observa-se que os animais instilados com PBS possuem pouca quantidade de colágeno depositado na arquitetura pulmonar (evidenciado em verde). Os focos se concentram nas regiões peribronquiais e perivascularares, com pouquíssimas fibras entre as células alveolares (Figura 42a). 30 dias após a instilação, percebe-se que nas regiões de espessamento tecidual induzido pelo composto 1100 há a substituição de tecido funcional por tecido fibrótico, em verde (Figura 42b) enquanto que no tecido pulmonar dos animais instilados com o composto 3150 essa deposição é muito menos pronunciada, até mesmo se igualando aos animais que receberam PBS. (Figura 42c). A região subpleural, que se tinha observado espessamento na coloração de H&E não houve deposição de colágeno (dados não mostrados).

1968

1971

1974



1977 **Figura 42: Fotomicrografias de secções do pulmão.** Coloração Tricrômico de Gomori. a) PBS, b) 1100 30 dpi e c) 3150 30 dpi. Seta laranja: regiões de deposição de colágeno. Fotomicrografias de a-c: aumento 10x.

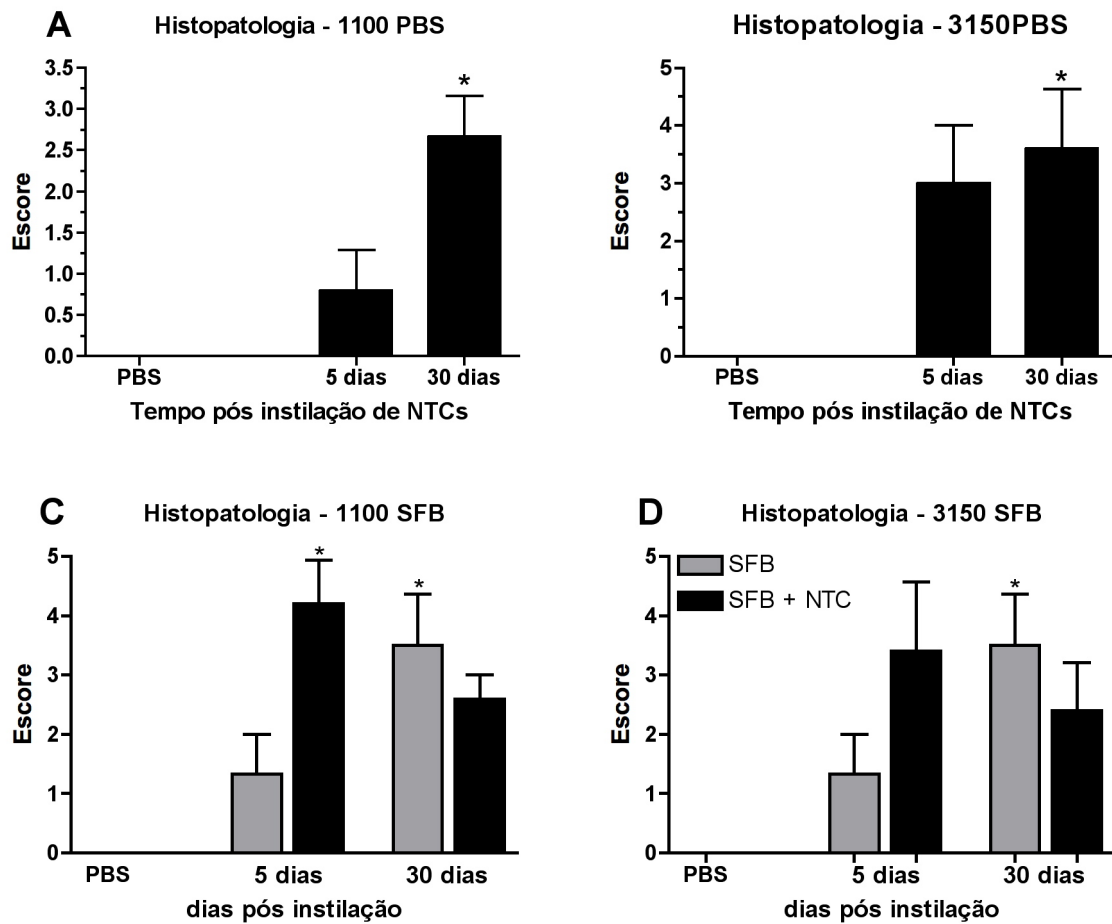
1980

Os nanotubos de carbono, nos 4 casos, foram capazes de induzir uma inflamação. Interessantemente, os resultados também mostraram que a instilação intranasal de SFB puro foi capaz de induzir inflamação. A inflamação causada pelos nanotubos de carbono foi analisada à luz de um escore elaborado por Hubbs (HUBBS *et al.*, 1997; HUBBS, 2002) e plotadas em forma de gráfico (Figura 43).

O PBS por si só não foi capaz de induzir efeito inflamatório. O composto 1100 foi capaz de induzir uma inflamação neutrofílica e granulomatosa, que no 5<sup>o</sup> dpi era mínima e focal. Ao longo do tempo, aumentou e, no 30<sup>o</sup> dpi, ela passou a ser leve e localmente extensiva (Figura 43a). Já o composto 3150 também causou uma inflamação tipicamente neutrofílica, porém, esta já começou leve e localmente extensiva no 5<sup>o</sup> dpi, modo no qual ela se manteve até o 30<sup>o</sup> dpi (Figura 43b).

A instilação intranasal de SFB puro foi capaz de gerar um contexto inflamatório do tipo neutrofílico e mononuclear. No 5<sup>o</sup> dpi tem-se uma inflamação mínima e focal (Figura 43c) que se agrava para um quadro leve e localmente extensiva no 30<sup>o</sup> dpi à medida que o número de células e área afetada aumenta.

Já a instilação intranasal dos compostos 1100 e 3150 solubilizados em SFB também foi capaz de induzir uma resposta inflamatória bem neutrofílica e granulomatosa em quadros inflamatórios bem semelhantes. Ambos os compostos, no 5<sup>o</sup> dpi, induziram uma inflamação leve e localmente extensiva. Entretanto, o quadro inflamatório reduziu no 30<sup>o</sup> dpi, passando a ser mínima e multifocal (Figuras 43c e 43d).



2004

2007

**Figura 43: Escore histopatológico da inflamação pulmonar causada pela instilação intranasal de NTC.** a) 1100 em PBS, b) 3150 em PBS, c) 1100 em SFB e d) 3150 em SFB. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA com pós teste de Teste de comparação múltipla de Dunn e Teste t de Student.  $^* = p < 0,05$ ;  $^{**} = p < 0,01$  e  $^{***} = p < 0,001$ .  $^*$  para diferenças entre os grupos em relação ao PBS.

**2010 5.4 - Sumário dos resultados**

Diante dos resultados obtidos, podemos sumarizar:

- 2013 • Alguns nanotubos de carbono são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio imediatamente após exposição em macrófagos RAW 264.7 cultivados *in vitro*;
- 2016 • Nanotubos de carbono foram capazes de induzir a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos THP-1 cultivados *in vitro*;
- Nanotubos de carbono não foram capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos THP-1 cultivados *in vitro*;
- 2019 • Nanotubos de carbono foram capazes de induzir a produção de IL-8 em células epiteliais pulmonares A549 cultivadas *in vitro*, mas a intensidade da indução variou com o tipo de nanotubo;
- 2022 • Os nanotubos de carbono testados foram capazes de causar lesão pulmonar e recrutamento leucocitário para o espaço alveolar;
- Os neutrófilos são as principais células presentes na resposta inflamatória pulmonar aguda ao passo que as células mononucleares exercem este papel na fase crônica;
- 2025 • A diluição em SFB melhora a dispersão dos NTCs e potencializa o efeito inflamatório
- 2028 • O próprio SFB, quando instilado causa inflamação pulmonar, mas sem causar fibrose pulmonar.
- 2031 • A longo prazo, nanotubos de carbono possuem potencial fibrogênico que pode ser exacerbado ou atenuado dependendo da estrutura física (tamanho e complexidade) e do meio e dispersão utilizado *in vivo*.
- 2034

## 6 - Discussão

2037 Desde o advento do asbesto grande esforço tem sido feito para se  
compreender os mecanismos de sua patologia, classicamente a asbestose, fibrose  
2040 (INCA). Deste esforço, dentro do âmbito da toxicologia, surgiu uma nova disciplina  
denominada toxicologia das fibras e que, desde seu surgimento, tem evoluído um  
2043 modelo que visa explicar patogenicidade encontrada nestes materiais, que é o mais  
robusto dentro da toxicologia de partículas: o paradigma das fibras.

Este paradigma se apóia em três pilares para explicar as características  
inflamatórias presentes nas fibras: o comprimento, o diâmetro e a biopersistência.  
2046 Deste modo, fica claro que a geometria da fibra é a característica mais importante  
para sua toxicologia e não mais sua composição química, a não ser quando sua  
composição contribui diretamente para sua biopersistência (DONALDSON, MURPHY  
2049 *et al.*, 2010). Esta independência química fica clara na medida em que este paradigma  
envolve vários tipos de materiais tais como asbesto anfibólio e serpentina, fibras  
cerâmicas e vítreas e até mesmo fibras orgânicas (DONALDSON, 2009).

2052 Sendo assim, é plausível de se pensar que esta teoria possa ser expansível  
aos nanotubos de carbono e que estes sejam considerados agentes patogênicos  
potencialmente perigosos. Isto se deve ao fato de que, apesar de serem feitos de um  
2055 material amorfo, o carbono, sua estrutura em forma de fibra (fina e longa) é  
biopersistente (LAM *et al.*, 2004; ELGRABLI, DAN *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2010).  
Portanto, com base nesta teoria, que coloca os NTCs na mesma classe de materiais  
2058 do asbesto, um material que fibroso é considerado capaz de causar lesão e fibrose  
pulmonar, grande importância tem sido dada aos nanotubos de carbono, não só na  
área da tecnologia e inovação, mas também no campo da toxicologia.

2061 O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se a exposição a nanotubos  
de carbono é capaz de induzir inflamação e fibrose pulmonar e paralelamente, verificar  
se estudos *in vitro* são confiáveis para se identificar e prever possíveis efeitos tóxicos  
2064 *in vivo*. Com este objetivo em mente, camundongos foram instilados intranasalmente  
com NTCs a uma dose de 50 µg por animal, em uma única administração. Esta dose  
foi escolhida porque, segundo os cálculos de Porter e colegas (2010) (baseado em  
2067 outros trabalhos), esta dose corresponderia a 5 meses de trabalho leve em um  
ambiente onde o trabalhador está exposto a uma dose de 400 µg/m<sup>3</sup>, portanto se



2070 aproxima razoavelmente a uma possível exposição ocupacional. Ao mesmo tempo, linhagens celulares correspondentes a células que estão presentes no pulmão foram cultivadas e estimuladas *in vitro* para a análise de produção de citocinas e outros mediadores do processo inflamatório.

2073 Estudos *in vitro* com fibroblastos e células epiteliais demonstraram que, dependendo das condições, os NTCs são capazes de não estimulá-las, estimulá-las ou até mesmo induzir efeito tóxico (CUI *et al.*, 2005; DAVOREN *et al.*, 2007; HERZOG  
2076 *et al.*, 2009; WANG, L. *et al.*, 2010; YAMASHITA *et al.*, 2010; PALOMÄKI *et al.*, 2011). Nossos resultados indicaram que os nanotubos utilizados neste trabalho foram capazes de estimular macrófagos RAW 264.7 e THP-1 a produzirem ROS, RNS e IL-  
2079 1 $\beta$  respectivamente e células A549 a produzirem IL-8. Entretanto, assim como observado por Pulskamp (2007), não observamos indução de TNF $\alpha$  em macrófagos THP-1 por estas nanopartículas.

2082 Embora não tenhamos estudado a ativação de caspase-1, este trabalho nos leva a hipotetizar que estes NTCs induzem estas células via receptores do Inflamassoma (NLRP3), devido a elevada produção de IL-1 $\beta$  e como demonstrado por  
2085 Palomaki (2011). Segundo Schoroder e Tschopp (2010), este receptor pode ser ativado por 3 vias distintas e não excludentes resultando na conversão de pró-IL-1 $\beta$ /IL-18 em IL-1 $\beta$ /IL-18 ativos: 1) via ATP/P2X<sub>7</sub>, 2) via desestabilização do lisossomo e 3)  
2088 via produção de ROS.

Nossos dados indicaram uma intensa indução da produção de ROS pelos nanotubos de carbono em células RAW 264.7, assim como Kagan (2010) e Cheng  
2091 (2009). Além do mais, como demonstrado por Davoren (2007) e Cheng (2009) os nanotubos de carbono podem invadir as células tanto por modo ativo (fagocitose) quanto pelo modo passivo (penetração da membrana plasmática) e ainda causar  
2094 desestabilidade da membrana plasmática. Nossas observações mostraram a presença de nanocompostos associados a leucócitos recolhidos do BAL de animais instilados, indicando a presença destes no interior de fagócitos. Frente a estes fatos,  
2097 pode-se supor que os NTCs podem também desestabilizar as membranas lisossomais quando fagocitados e ainda conseguir escapar destes passivamente, atingindo o citoplasma. Deste modo podemos sugerir que os NTCs são capazes de ativar a via  
2100 do Inflamassoma por duas vias que podem estar se complementando neste contexto:

a ativação via ROS e desestabilização do lisossomo, culminando na produção de IL-1 $\beta$ .

2103 Uma vez no citoplasma, NTCs podem ainda interagir com as organelas  
celulares. Uma vez capaz de desestabilizar a membrana celular, inerentemente, os  
2106 nanotubos de carbono teriam a capacidade de desestabilizar também as membranas  
das organelas. Uma vez danificadas, organelas como por exemplo a mitocôndria são  
capazes de produzir grandes quantidades de ROS, ativando ou reforçando esta via  
de ativação do Inflamassoma (ZHOU, YAZDI *et al.*, 2011). Dependendo da gravidade  
2109 do dano mitocondrial, os nanotubos de carbono poderiam ainda levar à sua destruição  
o que desencadearia na liberação de seu DNA no meio citoplasmático. O AIM2,  
membro da família HIN-200 (sensores citoplasmáticos de DNA dupla fita) que foi  
2112 recentemente descoberto, é capaz de reconhecer esse DNA mitocondrial liberado no  
meio citoplasmático e ativar a via do Inflamassoma (SCHRODER e TSCHOPP, 2010)  
reforçando ainda mais esta via inflamatória.

2115 *in vivo*, os dois nanotubos quando testados numa suspensão em PBS  
foram capazes de induzir inflamação aguda, com uma transmigração celular para as  
vias respiratórias já no primeiro dia pós instilação. Interessantemente, a inflamação  
2118 não seguiu os padrões da literatura, pois no quinto dia observou-se uma redução das  
células inflamatórias e, no 30<sup>o</sup> dia pós instilação, o número de células estava igual ao  
dos animais controles. Apesar disso, observou-se que o infiltrado inflamatório que  
2121 ocorre no 1<sup>o</sup> dia é composto basicamente por neutrófilos e macrófagos praticamente  
na mesma proporção, seguindo os padrões literários.

Vimos também que no parênquima pulmonar há uma diminuição do  
2124 número de macrófagos no primeiro dia pós instilação nos dois compostos e que esse  
número retorna aos níveis do animal PBS nos dias subsequentes. Esta diminuição  
imediate com uma posterior recuperação pode ter como causa a transmigração destas  
2127 células para as vias aéreas, como observadas no BAL. Deste modo, a curto prazo  
observou-se um baixo número de células no parênquima, mas que é novamente  
preenchido com a chegada de novas células nos dias posteriores à instilação. Este  
2130 fato também pode ser explicado pelos níveis de produção da quimiocina CCL2  
(citocina quimiotática para macrófagos (DEMOOR, BRACKE *et al.*, 2011)) no BAL e  
no pulmão. Percebe-se que no BAL esta quimiocina tem sua produção aumentada no  
2133 1<sup>o</sup> e no 30<sup>o</sup> dpi enquanto que no pulmão ela tem um pico somente no 1<sup>o</sup> dpi.

O número de células no parênquima pulmonar não aumenta em relação ao animal PBS, porque as células voltam a transmigrar para o espaço alveolar posteriormente, e no BAL não vimos o reflexo da transmigração, talvez porque a taxa de apoptose dessas células esteja alta ou talvez porque elas estejam deixando o tecido pelos vasos linfáticos, uma vez que os níveis de IL-1 $\beta$  no lavado broncoalveolar está alto o que sugere ativação destas células.

Embora muito efêmeros, os neutrófilos podem ter um papel bastante importante para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Segundo Kobayashi (2010) macrófagos alveolares são a maioria das células no espaço alveolar e são a primeira linha de defesa contra patógenos no pulmão. Entretanto, estas células não estão constantemente ativadas, produzindo citocinas pró-inflamatórias mesmo em constante contato com microrganismos no pulmão.

Isto se deve porque os macrófagos alveolares estão bloqueados de produzir tais citocinas mesmo quando em contato com LPS, porque eles tem uma alta expressão de IRAK-M (ou IRAK-3). Esta cinase bloqueia a sinalização de uma molécula importante para a produção de citocinas, a CD80. Durante a inflamação, o contato dos neutrófilos com os macrófagos induzem no ultimo a ativação de caspase-6, provavelmente via CD40/CD40L. A caspase-6 é a responsável por clivar IRAK-M e liberar a molécula CD80 para a sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias (KOBAYASHI *et al.*, 2010).

Desta forma, pode-se pensar que os neutrófilos, no modelo de inflamação induzida por nanotubos de carbono, fazem o “*licensing*” da resposta inflamatória, ou seja, eles iniciam a resposta desinibindo os macrófagos alveolares residentes. Uma vez iniciada resposta, os mediadores inflamatórios produzidos, como o CCL2, recrutam mais células que não estão suprimidas e dessa forma a inflamação se prolonga, uma vez que o estímulo do nanotubo de carbono é longo, devido à sua biopersistência.

Observamos também que os NTCs foram capazes de persistir por todo o período experimental e de estimular as células do parênquima pulmonar de forma independente. Além desta capacidade inerente de estimulação celular que os nanotubos possuem, um mecanismo que seria capaz de manter esta resposta inflamatória e até mesmo amplificá-la seria o da fagocitose frustrada, que é a incapacidade do macrófago em conseguir engolfar toda a partícula e assim realizar o

processo de fagocitose. Esta situação de falha fagocítica é pró-inflamatória, pois leva a liberação de radicais livres e citocinas para o meio extracelular, potencializando a inflamação (apud BERGSTRAND, 1990). Materiais fibrosos, como os nanotubos de carbono, que possuam mais de 15 µm de comprimento são bem prováveis de causar inflamação também por este processo (DONALDSON *et al.*, 2010).

Apesar da semelhança da resposta celular, observamos que os compostos 1100 e 3150 tiveram propriedades pró-fibrogênicas diferentes. Enquanto o primeiro causou fibrose pulmonar nos animais após 30 dias, o segundo não foi capaz de fazê-lo. Esta diferença no comportamento fibrogênico pode estar relacionada à pequenas nuances que encontramos no perfil da resposta inflamatória que precede a cicatrização e na morfologia do próprio nanotubo.

Primeiramente, observamos que, mesmo sendo capaz de estimular células A549 a produzirem IL-8 *in vitro*, o composto 3150 foi bem menos eficaz em promover esta indução, levando a níveis de quimiocinas menores. IL-8 está relacionado com o recrutamento de polimorfonucleares para o local da lesão que inicialmente seria feito pelas células epiteliais, uma vez que os macrófagos, em sua grande maioria, estariam impedidos de sintetizar e liberar esta quimiocina. De fato, observamos que o no parênquima pulmonar, há um menor recrutamento de neutrófilos já no primeiro dia quando o animal é instilado com este composto.

Além disso, vimos que o número destas células ao decorrer da inflamação induzida pelo composto 3150 diminui, chegando no mesmo nível dos animais instilados com PBS. Uma situação contrária ocorre nos animais instilados com o composto 1100, onde observamos que há um grande infiltrado de neutrófilos e que este aumenta ainda mais com o decorrer da inflamação.

O acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar parece ser bastante importante para o desenvolvimento de fibrose pulmonar. Em experimentos anteriores do nosso laboratório, Russo (2005) demonstrou que o bloqueio farmacológico do receptor CXCR2, importante para o recrutamento neutrofílico via CXCL-1, diminui o acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar e conseqüentemente a fibrose pulmonar, em um modelo de fibrose induzida por bleomicina.

A presença de neutrófilos está relacionada com a liberação de elastases e metaloproteinases, que são enzimas responsáveis pelo afrouxamento e estresse da

2199 matriz extracelular. No pulmão, isto permite a transmigração celular para o espaço  
alveolar e o remodelamento tecidual. Entretanto, elas também induzem a  
diferenciação e ativação de fibroblastos em miofibroblastos e a transição  
2202 epitelial-mesenquimal (reprogramação das células epiteliais pulmonares  
transformando-as em uma célula “fibroblasto-like”). Em uma situação onde há o  
acúmulo de neutrófilos, este efeito pode ser exagerado levando à deposição de matriz  
2205 extracelular excessiva e fibrose (WYNN, 2011; FUJINO, KUBO *et al.*, 2012).

Também observamos que os dois compostos induziram a produção de IL-  
1 $\beta$  e TNF $\alpha$  no parênquima pulmonar no 5<sup>o</sup> dia pós instilação. Estas duas citocinas são  
2208 consideradas pró-fibrogênicas, na medida que são capazes de ativar e estimular  
fibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos, células ativas e secretoras de  
matriz celular. Entretanto, após instilação com o composto 3150, não observamos a  
2211 produção da principal citocina ativadora dos fibroblastos: o TGF- $\beta$ 1. Isto pode indicar  
que este tipo de nanotubo foi capaz de induzir inflamação, mas que por algum motivo  
não houve produção desta importante citocina pro-fibrogênica, e portanto, os  
2214 fibroblastos não foram ativados.

A presença de TNF $\alpha$  no parênquima pulmonar nos chamou a atenção  
porque a estimulação *in vitro* de macrófagos com nanotubos de carbono não induziu  
2217 a produção desta citocina. Sua produção pode ser um processo secundário, através  
por exemplo de receptores do tipo Toll que reconhecem padrões de perigo liberados  
pelas células que morreram devido ao NTC. No entanto, pensamos que outro evento  
2220 também possa estar ocorrendo: os NETs (“*neutrophil extracellular traps*”).

NETs são extrusões feitas por neutrófilos cujo objetivo é imobilizar e matar  
microrganismos. Estas redes têm um arcabouço de DNA e histonas que é  
2223 complementado com vários peptídeos microbianos (AMULIC e HAYES, 2011). Devido  
ao seu arcabouço ser formado de DNA e histonas, pode ser que estas estruturas,  
além de matar os microrganismos através de seus peptídeos antimicrobianos, podem  
2226 também estar relacionadas com a ativação do sistema imune através, por exemplo,  
de receptores do tipo Toll. Pode ser que receptores *Toll-like* 9 (capaz de  
reconhecimento de DNA fita dupla (KAWAI e AKIRA, 2009)), *Toll-like* 2 e *Toll-like* 4  
2229 (capazes de reconhecer histonas extracelulares (SEMERARO, AMMOLLO *et al.*,  
2011)) possam participar desta ativação.

Estudos recentes demonstraram que a formação de NETs é dependente da geração de estresse oxidativo e está relacionada à produção de IL-1 $\beta$  em um modelo de gota (MITROULIS, KAMBAS *et al.*, 2011; NISHINAKA, ARAI *et al.*, 2011). Como estes três elementos estão presentes na inflamação induzida por nanotubos de carbono, achamos plausível que também haja o envolvimento de NETs no nosso modelo de inflamação por nanotubos de carbono.

Observamos também uma diferença na cinética de produção de IL-6 entre os dois compostos. Enquanto a instilação do composto 1100 induziu rapidamente a produção de IL-6, 1<sup>o</sup> dia pós instilação, o composto 3150 induziu a produção desta citocina somente no 5<sup>o</sup> dia. Embora tenha relatos de que IL-6 possa mediar a transição entre a resposta inflamatória aguda e a crônica (KAPLANSKI, MARIN *et al.*, 2003), mesmo com essa diferença temporal de expressão, não observamos diferença no tempo de transição entre as duas respostas na inflamação induzida pelos dois compostos.

Entretanto, acreditamos que o papel principal desta citocina neste modelo esteja relacionado com sua ação em conjunto com TGF- $\beta$ 1. Atuando em conjunto, estas duas citocinas induzem células T *naïve* a se diferenciarem em células Th17, produtoras de IL-17A (WEAVER e HATTON, 2009) e nos tecidos, IL-6 promove a manutenção destas células quando inflamados (NEURATH e FINOTTO, 2011). Além de IL-17, estes linfócitos liberam também IL-21, um fator importante para a diferenciação Th2 de linfócitos.

Linfócitos com o perfil Th2 liberam IL-4 e IL-13 e possui ação pró-fibrogênica. IL-4 juntamente com IL-13 atua sobre macrófagos polarizando-os para um perfil M2, induzindo a produção de TGF- $\beta$ 1 que ativará os fibroblastos, conferindo-lhes um perfil pro-fibrogênico. Além disso, IL-13 sozinha possui atividade sobre os fibroblastos ativando-os por uma via independente de TGF-  $\beta$ 1 (WYNN, 2011).

Sendo assim, nota-se que o ambiente inflamatório criado pelo composto 1100 tem um potencial fibrogênico elevado em relação ao criado pelo composto 3150, uma vez que nele temos a convergência de duas vias fibrogênicas (TGF-  $\beta$ 1 e IL-13) devido à própria ativação dos fibroblastos e também devido à ação conjunta da IL-6/TGF- $\beta$ 1 que leva a ação de linfócitos Th17, algo que não ocorre para o composto 3150. Tal fato poderia explicar a diferença observada na fibrose pulmonar.

Outra diferença notada entre os nanotubos de carbono, desta vez sobre sua morfologia, é que os nanotubos 1100 são muito grandes, com muitos micrômetros de comprimento enquanto que os 3150 são muito menores, geralmente com menos de 1 micrômetro. Este fato também nos permite hipotetizar que, grande parte da toxicidade do composto 1100 pode vir do fato dele ser muito comprido, o que leva à já citada fagocitose frustrada. Entretanto, o composto 3150 não seria capaz de induzi-la, devido ao seu tamanho diminuto.

Uma vez que estes nanotubos seriam capazes de ser fagocitados completamente, eles poderiam ser eliminados mais rapidamente do tecido causando assim menos fibrose. Estudos recentes mostraram que, de fato, nanotubos podem ser degradados por mieloperoxidases que estão presentes tanto em macrófagos (pequenas quantidades) quanto em neutrófilos (altas quantidades) (KAGAN *et al.*, 2010). No entanto, como observado nos nossos experimentos, os neutrófilos possuem um papel muito rápido na inflamação, por volta de um dia. Portanto, esta degradação no tecido seria bem mais lenta, uma vez que macrófagos possuem uma concentração muito baixa dessas enzimas no citoplasma. Além do mais, atualmente, não há registros disponíveis sobre os mecanismos de degradação que estariam envolvidos no processo, e ainda, não há definido ainda fagócitos ou tecidos específicos que seriam capazes de induzir tal degradação (BIANCO, KOSTARELOS *et al.*, 2011). Todavia, esta degradação enzimática ocorre em nanotubos que foram funcionalizados previamente, não ocorrendo em nanotubos não funcionalizados que é o principal material envolvendo exposição laboral e os utilizados neste estudo.

Contudo, não podemos deixar de considerar que o composto 3150 pode não ter causado fibrose pulmonar porque ele não atingiu os espaços alveolares em quantidades suficientes. Como dito anteriormente, durante os experimentos, foi notado que logo que se cessava os procedimentos de solubilização estes nanotubos rapidamente formavam grandes aglomerados, assim como Porter (2010) também relatou, que poderiam ser impedidos de chegar no espaço alveolar através das células ciliadas da traquéia.

Para tentar resolver o problema, procuramos por um solvente que deixaria a suspensão de NTCs estável e dispersa por mais tempo. Após estudos na literatura, optamos por tentar a solubilização em SFB, que por ser uma solução que possui uma boa quantidade de proteínas, seria capaz de exercer esta função, segundo (VIPPOLA,

FALCK *et al.*, 2009; PORTER *et al.*, 2010; WANG, X. *et al.*, 2010). Também acreditávamos que mesmo sendo um soro de outra espécie, isto não seria um problema, pois a exposição seria única, não gerando assim uma resposta específica para as proteínas do soro.

Entretanto, para nossa surpresa, o SFB sozinho foi capaz de induzir inflamação e que persistiu pelos 30 dias de experimentos com infiltrado celular e produção de citocinas. O fato curioso é que, mesmo com este contexto inflamatório, a administração de SFB não causou o desenvolvimento de fibrose pulmonar.

Quando instilamos NTCs solubilizados em SFB, também vimos que eles foram capazes de induzir inflamação, com um perfil celular bastante parecido com os nanotubos instilados em PBS. O perfil de produção de citocinas no BAL foi de certa forma similar aos nanotubos instilados em PBS, porém, no pulmão, o nível de citocinas foi muito mais elevado, com exceção de TGF- $\beta$ 1. Como resultado deste processo inflamatório, vimos que os dois compostos foram capazes de induzir fibrose pulmonar nos camundongos após 30 dias. Curiosamente, a administração com SFB diminuiu a característica fibrogênica do composto 1100 e conferiu esta característica ao composto 3150.

Acreditamos que a deposição de colágeno no pulmão encontrada nestes grupos foi devido grande aumento da produção de citocinas. Porém, um fato que ainda nos intriga é o por quê que os NTCs causaram fibrose e o SFB sozinho não, porque: as duas soluções causaram inflamação persistente, em alguns casos o soro induziu uma resposta até mesmo maior que a do NTC e que o SFB foi capaz de promover acúmulo de neutrófilos no pulmão ao longo do tempo.

Além disso, o fato de o composto 3150 ter sido mais bem disperso pelo soro, pode ter feito com que ele chegasse em maior quantidade até os espaços alveolares e desencadeasse o processo, que antes não havia ocorrido devido aos grandes aglomerados formados. Quanto ao fato do menor poder indutor de fibrose no composto 1100, isto pode ter ocorrido porque a adsorção de proteínas na sua superfície pode ter alterado o modo como este nanotubo interage com as células. Com menor superfície exposta, este nanotubo pode ter induzido um menor estresse oxidativo, por exemplo, e menor desestabilização das membranas celulares das células epiteliais (LAURENT, BURTEA *et al.*, 2012).



2328 Mesmo com os avanços obtidos nos últimos anos, para que se tenha  
resultados que possam ser comparáveis e confiáveis a respeito das nanopartículas, a  
comunidade científica está começando a ficar ciente de que são necessárias algumas  
2331 novas padronizações, adaptações e modificações dos testes atualmente utilizados.

Com este objetivo em mente, alguns pesquisadores sugerem que, na área  
da nanotoxicologia, a unidade de referência não seja mais a tradicional peso/volume,  
2334 pois uma vez que se trata de partículas que possuem área, o mais indicado nestas  
situações seria superfície ativa/volume. Como o peso/volume não seria uma medida  
confiável para testes de nanotoxicidade, alguns autores também criticam as doses  
2337 utilizadas nos experimentos, alegando que elas podem não ser representativas de  
uma exposição real, superestimando assim os resultados (The dose makes the  
poison., 2011).

2340 Por último, também está em questão se os métodos de avaliação *in vitro*  
atualmente utilizados são confiáveis para se avaliar a toxicidade. Além de não levarem  
em conta a interação que estas nanopartículas podem ter com os meios utilizados, os  
2343 teste atuais não levam em conta que ao longo do tempo, estes materiais se decantam,  
portanto, em um ensaio de toxicidade, após algum tempo, a concentração efetiva em  
que as células se encontram é muito maior do que a desejada e estipulada para o  
2346 estudo, o que acarreta em super absorção dos materiais levando a uma toxicidade  
irreal (The dose makes the poison., 2011; LAURENT *et al.*, 2012).

Analisando todos estes dados, percebe-se o quão complicado é trabalhar  
2349 com nanoestruturas, em especial os nanotubos de carbono, pois cada detalhe reflete  
em um comportamento da molécula que, no fim, pode gerar um resultado  
completamente diferente. Somando-se a isto, tem-se a fibrose pulmonar, uma doença  
2352 complexa, que pode ter vários fatores desencadeantes, que ainda não tem um  
tratamento específico e que não dominamos completamente suas etapas.

No momento, as técnicas *in vitro* que temos disponíveis para avaliar  
2355 toxicidade de nanomateriais são metodologias que avaliam pontualmente cada  
aspecto do sistema imune, não havendo (ou havendo muito pouca) integração entre  
as suas várias facetas. Além disso, eles geram resultados que podem não refletir o  
2358 que se encontra *in vivo*, pois não conhecemos a fundo o comportamento das  
nanopartículas nos diversos meios utilizados para estes ensaios. Desta forma, a  
maneira mais confiável de se estudar algum efeito tóxico destas nanopartículas, ainda

2361 é de maneira *in vivo*, pois, atualmente, não é possível prever o comportamento de uma molécula complexa em uma situação biológica complexa.

**2364 7 - Conclusão**

2367 Em conjunto estes dados nos indicam que a exposição pulmonar aos  
nanotubos de carbono gera um processo inflamatório agudo inicial e crônico, e quando  
persistente pode levar de ao desencadeamento de uma cicatrização excessiva, marca  
característica da fibrose. No entanto, o processo de fibrose pulmonar parece depender  
2370 diretamente da complexidade da estrutura, do grau de dispersão dos nanotubos e do  
meio utilizado. Desta forma, atualmente, a exposição humana e ambiental a estes  
nanocompostos deve ser evitada, monitorada e tida como algo perigoso que pode  
acarretar problemas futuros.

2373 Os ensaios *in vitro* nos mostraram, que ainda não são ferramentas  
substancialmente precisas para se prever algum risco em potencial causado pela  
exposição aos nanotubos de carbono. Para isto, são necessários uma melhor  
2376 compreensão do comportamento destes nanocompostos e melhorias nos métodos  
que visam minimizar falsos resultados. Além do mais, os nosso dados *in vivo*  
indicaram que o uso de modelos biológicos mais complexos, através da avaliação da  
2379 resposta imune pulmonar e fibrose em camundongos, são relevantes para predizer  
com maior fidelidade os aspectos tóxicos causados pela exposição aos diferentes  
nanocompostos de carbono quando comparados aos ensaios *in vitro*.

2382

## Anexos

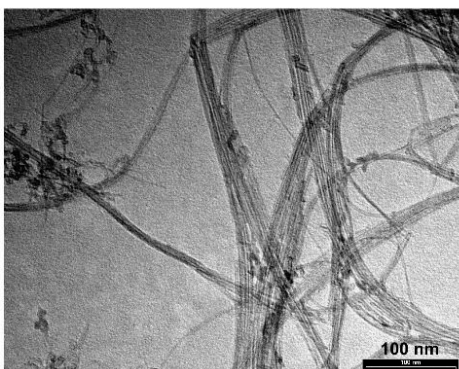
## 7.1 - Especificações técnicas do composto 1100



Ref: NANOCYL™ NC1000 – 10 March 2009 - V03

**NANOCYL™ NC1000 series - Product Datasheet –  
Single-Wall Isolated and Bundled Carbon Nanotubes**

**General information**



NANOCYL™ NC1000 series single-wall carbon nanotubes are produced via the catalytic carbon vapor deposition (CCVD) process. Nanotubes which exit the reactor are then purified to greater than 70% carbon to produce the 1100 grade. This grade is then functionalized with COOH to produce the 1101 grade. These products are available in 1 to 10 gram order quantities.

A primary interest is in applications requiring high specific surface area (BET >1000 m<sup>2</sup>/g).

**Characterization NC1000, NC1100**

PROPERTY	UNIT	VALUE	METHOD OF MEASUREMENT
Average Diameter	nanometers	2	HRTEM, Raman
Length	microns	several	TEM
Carbon Purity	%	> 70	TGA
Specific Surface Area	m <sup>2</sup> /gram	>1000	BET
Metal Oxide & Carbon Shells	%	< 30	TGA
Amorphous Carbon	%	n.a.	HRTEM
-COOH Functionalization (NC1101)	%	Up to 5	XPS

**+ Further information is available upon request**

The information contained on this datasheet is believed to be reliable— yet Nanocyl makes no warranties and assumes no liability in connection with any use of this information. Nothing herein is to be taken as a license to operate under or infringe any patent. While this information is accurate at the time of publication, please contact Nanocyl or check <http://www.nanocyl.com> for the most up-to-date information.

**Nanocyl S.A.**

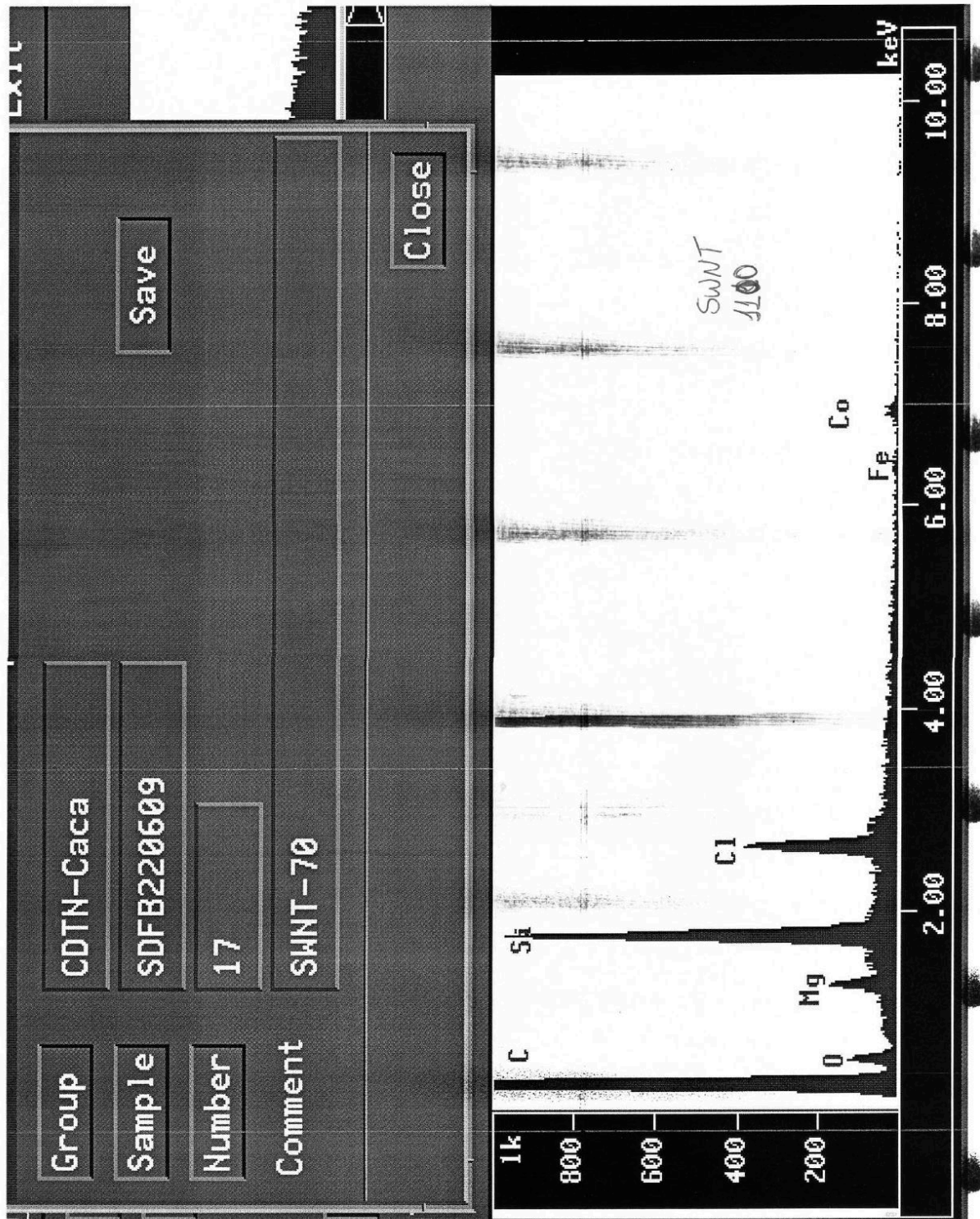
Rue de l'Essor 4      Tel +32 71 750 380  
B-5060 Sambreville      Fax +32 71 750 390  
BELGIUM      sales@nanocyl.com

**US contact**

info-us@nanocyl.com

[www.nanocyl.com](http://www.nanocyl.com)

### 7.2 - Composição química do composto 1100



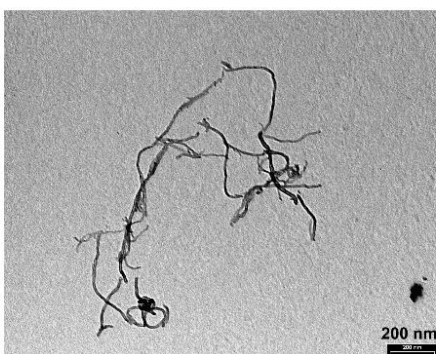
## 2388 7.3 - Especificações técnicas do composto 3150



Ref: NANOCYL™ NC3150 – 10 March 2009 - V03

### NANOCYL™ NC3150 series - Product Datasheet – Short Thin Multi-Wall Carbon Nanotubes

#### General information



NANOCYL™ NC3150 series thin multi-wall carbon nanotubes are produced via the catalytic carbon vapor deposition (CCVD) process. Nanotubes which exit the reactor are then purified to greater than 95% carbon to produce the 3100 grade. This grade is then functionalized with Nanocyl patented process to produce the 3150 grades. These products are available in 1 to 100 gram order quantities.

A primary interest is in applications requiring surface chemistry characteristics and ease of dispersability.

#### Characterization NC3150, NC3151, NC3152

PROPERTY	UNIT	VALUE	METHOD OF MEASUREMENT
Average Diameter	nanometers	9.5	TEM
Average Length	microns	< 1	TEM
Carbon Purity	%	> 95	TGA
Metal Oxide	%	< 5	TGA
Amorphous Carbon	-	*	HRTEM
-COOH Functionalization (NC3151)	%	< 4	XPS
-NH <sub>2</sub> Functionalization (NC3152)	%	< 0.5	XPS

\* Pyrolytically deposited carbon on the surface of the CNT

#### + Further information is available upon request

The information contained on this datasheet is believed to be reliable— yet Nanocyl makes no warranties and assumes no liability in connection with any use of this information. Nothing herein is to be taken as a license to operate under or infringe any patent. While this information is accurate at the time of publication, please contact Nanocyl or check <http://www.nanocyl.com> for the most up-to-date information.

#### Nanocyl S.A.

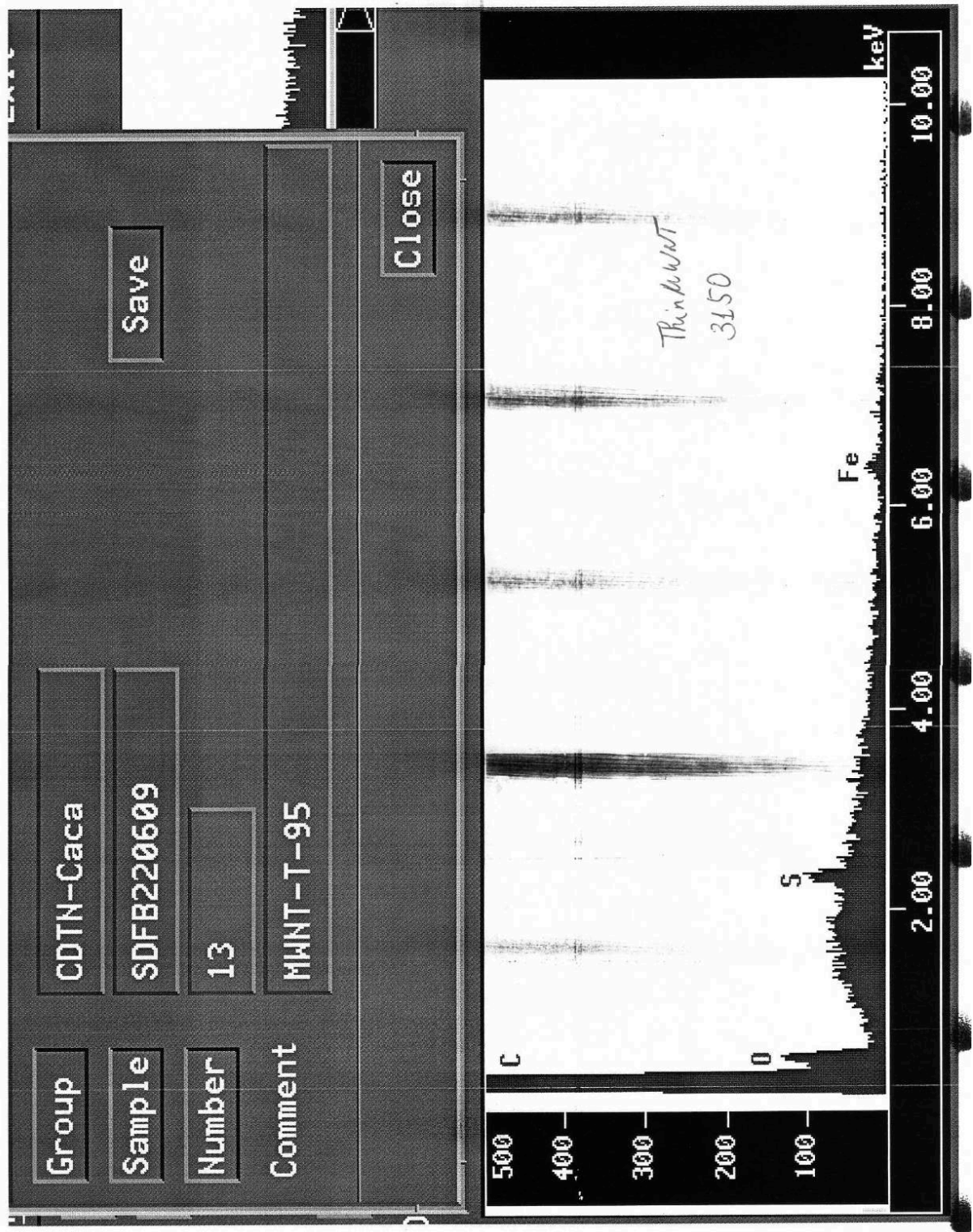
Rue de l'Essor 4 Tel +32 71 750 380  
B-5060 Sambreville Fax +32 71 750 390  
BELGIUM sales@nanocyl.com

#### US contact

info-us@nanocyl.com

[www.nanocyl.com](http://www.nanocyl.com)

### 7.4 - Composição química do composto 3150



## 7.5 - Aprovação concedida pelo CTEA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 191/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de nanomateriais e de possíveis mecanismos de ação**", que tem como responsável(is) **Mauro Martins Teixeira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 10/2010**.

Este certificado expira-se em **27/ 10/ 2015**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 191/2010**, related to the project entitled "**Evaluation of toxicity by nanomaterials and possible mechanisms of action**", under the supervisors of **Mauro Martins Teixeira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 27, 2010**.

This certificate expires in **October 27, 2015**.

Belo Horizonte, 29 de Outubro de 2010.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod. Cert. v1.0)



## 8 - Bibliografia

- 2397 ALI-BOUCETTA, H.; AL-JAMAL, K.T.; MÜLLER, K.H.; LI, S.; PORTER, A.E.;  
EDDAOUDI, A.; PRATO, M.; BIANCO, A. & KOSTARELOS, K. Cellular Uptake and  
Cytotoxic Impact of Chemically Functionalized and Polymer-Coated Carbon  
Nanotubes. **Small**, v.7, n.22, Sep 15, p.3230-3238. 2011.
- 2400 AMULIC, B. & HAYES, G. Neutrophil extracellular traps. **CURBIO**, v.21, n.9, Jun 10,  
p.R297-R298. 2011.
- 2403 BACON, R. Growth, structure, and properties of graphite whiskers. **J Appl Phys**, v.31,  
p.286-290. 1960.
- 2406 BERGSTRAND, H. The generation of reactive oxygen-derived species by phagocytes.  
**Agents and actions. Supplements**, v.30, p.199-211. 1990.
- 2409 BETHUNE, D.; KIANG, C.; VRIES, M.D.; GORMAN, G.; SAVOY, R.; VAZQUEZ, J. &  
BEYERS, R. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer  
walls. **Nature**, v.363, p.605-607. 1993.
- 2412 BIANCO, A.; KOSTARELOS, K. & PRATO, M. Making carbon nanotubes  
biocompatible and biodegradable. **Chemical Communications**, v.47, n.37, p.10182.  
2011.
- 2415 BOCZKOWSKI, J. & LANONE, S. Potential uses of carbon nanotubes in the medical  
field: how worried should patients be? **Nanomedicine (London, England)**, v.2, n.4,  
Aug, p.407-410. 2007.
- 2421 CHENG, C.; MÜLLER, K.H.; KOZIOL, K.K.K.; SKEPPER, J.N.; MIDGLEY, P.A.;  
WELLAND, M.E. & PORTER, A.E. Toxicity and imaging of multi-walled carbon  
nanotubes in human macrophage cells. **Biomaterials**, v.30, n.25, Sep 01, p.4152-  
4160. 2009.
- 2424 CROUZIER, D.; FOLLOT, S.; GENTILHOMME, E.; FLAHAUT, E.; ARNAUD, R.;  
DABOUIS, V.; CASTELLARIN, C. & DEBOUZY, J.C. Carbon nanotubes induce  
inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung.  
2430 **Toxicology**, v.272, n.1-3, Jul 04, p.39-45. 2010.
- 2433 CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M. & GAO, H. Effect of single wall carbon  
nanotubes on human HEK293 cells. **Toxicology letters**, v.155, n.1, Feb 15, p.73-85.  
2005.
- 2436 DAVOREN, M.; HERZOG, E.; CASEY, A.; COTTINEAU, B.; CHAMBERS, G.; BYRNE,  
H.J. & LYNG, F.M. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on  
human A549 lung cells. **Toxicology in vitro : an international journal published in  
2439 association with BIBRA**, v.21, n.3, May 01, p.438-448. 2007.
- 2442 DE CARVALHO, C.V. Amianto. Deputados, C.L.D.C.D. Brasília, DF: Câmara dos  
Deputados: 1-95 p. 2009.
- 2445 DEMOOR, T.; BRACKE, K.R.; DUPONT, L.L.; PLANTINGA, M.; BONDUE, B.; ROY,  
M.-O.; LANNOY, V.; LAMBRECHT, B.N.; BRUSSELLE, G.G. & JOOS, G.F. The Role

- of ChemR23 in the Induction and Resolution of Cigarette Smoke-Induced Inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)**, Apr 23. 2011.
- 2448 DONALDSON, K. The inhalation toxicology of p-aramid fibrils. **Critical reviews in toxicology**, v.39, n.6, p.487-500. 2009.
- 2451 DONALDSON, K.; MURPHY, F.A.; DUFFIN, R. & POLAND, C.A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. **Particle and fibre toxicology**, v.7, p.5. 2010.
- 2454 DONALDSON, K.; STONE, V.; TRAN, C.L.; KREYLING, W. & BORM, P.J.A. Nanotoxicology. **Occupational and environmental medicine**, v.61, n.9, Sep, p.727-728. 2004.
- 2460 ELGRABLI, D.; ABELLA-GALLART, S.; ROBIDEL, F.; ROGERIEUX, F.; BOCZKOWSKI, J. & LACROIX, G. Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. **Toxicology**, v.253, n.1-3, Nov 20, p.131-136. 2008.
- 2463 ELGRABLI, D.; FLORIANI, M.; ABELLA-GALLART, S.; MEUNIER, L.; GAMEZ, C.; DELALAIN, P.; ROGERIEUX, F.; BOCZKOWSKI, J. & LACROIX, G. Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. **Particle and fibre toxicology**, v.5, p.20. 2008.
- 2466 FUJINO, N.; KUBO, H.; SUZUKI, T.; HE, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; TAKAHASHI, T.; OTA, C. & YAMAYA, M. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice. **Experimental lung research**, v.38, n.1, Mar, p.28-36. 2012.
- 2472 GAHARWAR, A.K.; SCHEXNAILDER, P.J. & SCHMIDT, G. Nanocomposite Polymer Biomaterials for Tissue Repair of Bone and Cartilage: A Material Science Perspective. Jul 22, p.1-28. 2011.
- 2475 HENNRICH, F.; CHAN, C.; MOORE, V.; ROLANDI, M. & CONNELL, M. The element carbon. In: **Carbon Nanotubes: Properties and Applications**. Connel, M. (Ed.). Boca Raton, FL: CRC, 2006. p.1-18
- 2481 HERZOG, E.; BYRNE, H.J.; DAVOREN, M.; CASEY, A.; DUSCHL, A. & OOSTINGH, G.J. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.236, n.3, Jun 01, p.276-281. 2009.
- 2487 HUBBS, A. Necrosis of Nasal and Airway Epithelium in Rats Inhaling Vapors of Artificial Butter Flavoring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.185, n.2, Dec 01, p.128-135. 2002.
- 2490 HUBBS, A.F.; CASTRANOVA, V.; MA, J.Y.; FRAZER, D.G.; SIEGEL, P.D.; DUCATMAN, B.S.; GROTE, A.; SCHWEGLER-BERRY, D.; ROBINSON, V.A.; VAN DYKE, C.; BARGER, M.; XIANG, J. & PARKER, J. Acute lung injury induced by a commercial leather conditioner. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.143, n.1, Apr, p.37-46. 1997.
- 2496

- 2499 HURT, R.; MONTHIOUX, M. & KANE, A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. **Carbon**, v.44, n.6, Jun, p.1028-1033. 2006.
- 2502 IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon . **Nature**, v.345, p.56-58. 1991.
- 2505 IIJIMA, S. & ICHIHASHI, T. Single-Shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, v.363, p.603-605. 1993.
- 2508 JIANG, K.; JIANG, K.; JIANG, K.; et al. Superaligned carbon nanotube arrays, films, and yarns: a road to applications. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)**, v. 23, n. 9, p. 1154–1161, 2011.
- 2511
- 2514 KAGAN, V.E.; KONDURU, N.V.; FENG, W.; ALLEN, B.L.; CONROY, J.; VOLKOV, Y.; VLASOVA, I.I.; BELIKOVA, N.A.; YANAMALA, N.; KAPRALOV, A.; TYURINA, Y.Y.; SHI, J.; KISIN, E.R.; MURRAY, A.R.; FRANKS, J.; STOLZ, D.; GOU, P.; KLEIN-SEETHARAMAN, J.; FADEEL, B.; STAR, A. & SHVEDOVA, A.A. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. **Nature nanotechnology**, v.5, n.5, Jun 01, p.354-359. 2010.
- 2517
- 2520 KAM, N.W.S.; O&APOS;CONNELL, M.; WISDOM, J.A. & DAI, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.33, Aug 16, p.11600-11605. 2005.
- 2523
- 2526 KANAREK, M.S. Mesothelioma from Chrysotile Asbestos: Update. **Annals of Epidemiology**, v.21, n.9, Sep 01, p.688-697. 2011.
- 2529 KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A. & FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in immunology**, v.24, n.1, Feb, p.25-29. 2003.
- 2532
- 2535 KAWAI, T. & AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v.21, n.4, May 01, p.317-337. 2009.
- 2538 KOBAYASHI, H.; NOLAN, A.; NAVEED, B.; HOSHINO, Y.; SEGAL, L.N.; FUJITA, Y.; ROM, W.N. & WEIDEN, M.D. Neutrophils Activate Alveolar Macrophages by Producing Caspase-6-Mediated Cleavage of IL-1 Receptor-Associated Kinase-M. **Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)**, v.186, n.1, Dec 20, p.403-410. 2010.
- 2541 KROTO, H.; HEATH, J.; O&APOS;BRIEN, S.; CURL, R. & SMALLEY, R. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v.318, p.162-163. 1985.
- 2544 LAM, C.-W.; JAMES, J.T.; MCCLUSKEY, R. & HUNTER, R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v.77, n.1, p.126-134. 2004.
- 2547

- 2550 LAURENT, S.; BURTEA, C.; THIRIFAYS, C.; HÄFELI, U.O. & MAHMOUDI, M. Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications and “Cell Vision”. **PloS one**, v.7, n.1, Feb 10, p.e29997. 2012.
- 2553 LAZARUS, A.A. & PHILIP, A. Asbestosis. **YMDA**, v.57, n.1, Feb 01, p.14-26. 2011.
- 2556 LEAL, M.L.C.M.; WIGHTMAN, J.; MARQUES, R.A.; PONTES, C.H.; ILOGTI, K.C.L.D.S.; ALVES, P.O.L.; FREITAS, M.L. & BARROS, M. Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília, DF: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI): 1-60 p. 2011.
- 2559 LIU, G.; BERI, R.; MUELLER, A. & KAMP, D.W. Molecular mechanisms of asbestos-induced lung epithelial cell apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v.188, n.2, 2562 Nov 05, p.309-318. 2010.
- 2565 MITROULIS, I.; KAMBAS, K.; CHRYSANTHOPOULOU, A.; SKENDROS, P.; APOSTOLIDOU, E.; KOURTZELIS, I.; DROSOS, G.I.; BOUMPAS, D.T. & RITIS, K. Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Associated with IL-1 $\beta$  and Autophagy-Related Signaling in Gout. **PloS one**, v.6, n.12, Dec 16, p.e29318. 2011.
- 2568 MONTEIRO-RIVIERE, N.A. & INMAN, A.O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. **Carbon**, v.44, n.6, p.1070-1078. 2006.
- 2571 MULLER, J.; HUAUX, F.; MOREAU, N.; MISSON, P.; HEILIER, J.-F.; DELOS, M.; ARRAS, M.; FONSECA, A.; NAGY, J.B. & LISON, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, n.3, Sep 15, 2574 p.221-231. 2005.
- 2577 NEURATH, M.F. & FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v.22, 2580 n.2, May, p.83-89. 2011.
- 2583 NISHINAKA, Y.; ARAI, T.; ADACHI, S.; TAKAORI-KONDO, A. & YAMASHITA, K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and biophysical research communications**, v.413, n.1, Sep 16, p.75-79. 2011.
- 2586 OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E. & OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental health perspectives**, v.113, n.7, Jul, p.823-839. 2005.
- 2589 OBERLIN, A.; ENDO, M. & KOYAMA, T. Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. **J Cryst Growth**, v.32, p.335-349. 1976.
- 2592 PALOMÄKI, J.; VÄLIMÄKI, E.; SUND, J.; VIPPOLA, M.; CLAUSEN, P.A.; JENSEN, K.A.; SAVOLAINEN, K.; MATIKAINEN, S. & ALENIUS, H. Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar 2595 Mechanism. **ACS nano**, Aug 03. 2011.
- 2598 PARK, E.-J.; CHO, W.-S.; JEONG, J.; YI, J.; CHOI, K. & PARK, K. Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. **Toxicology**, v.259, n.3, Jun 17, p.113-121. 2009.

- 2601 PEIGNEY, A.; LAURENT, C.; FLAHAUT, E.; BACSA, R. & ROUSSET, A. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. **Carbon**, v.39,  
2604 n.4, p.507-514. 2001.
- PERUZZO, F.M. & LEITE DO CANTO, E. Química na Abordagem do Cotidiano. **Ed. Moderna**, v.3, p.569-571. 2006.
- 2607
- 2610 PORTER, D.; SRIRAM, K.; WOLFARTH, M.; JEFFERSON, A.; SCHWEGLER-BERRY, D.; ANDREW, M.E. & CASTRANOVA, V. A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. **Nanotoxicology**, v.2, n.3, Feb, p.144-154. 2008.
- 2613 PORTER, D.W.; HUBBS, A.F.; MERCER, R.R.; WU, N.; WOLFARTH, M.G.; SRIRAM, K.; LEONARD, S.; BATTELLI, L.; SCHWEGLER-BERRY, D.; FRIEND, S.; ANDREW, M.; CHEN, B.T.; TSURUOKA, S.; ENDO, M. & CASTRANOVA, V. Mouse pulmonary  
2616 dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. **Toxicology**, v.269, n.2-3, Apr 10, p.136-147. 2010.
- 2619 PULSKAMP, K.; DIABATÉ, S. & KRUG, H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicology letters**, v.168, n.1, Feb 10, p.58-74. 2007.
- 2622
- 2625 REDDY, G.K. & ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v.29, n.3, Jul 01, p.225-229. 1996.
- 2628 RIVAS, G.A.; RUBIANES, M.D.; RODRÍGUEZ, M.C.; FERREYRA, N.F.; LUQUE, G.L.; PEDANO, M.L.; MISCORIA, S.A. & PARRADO, C. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta**, v.74, n.3, Dec 15, p.291-307. 2007.
- 2631 ROMAN, J.A.; NIEDZIELKO, T.L.; HADDON, R.C.; PARPURA, V. & FLOYD, C.L. Single-walled carbon nanotubes chemically functionalized with polyethylene glycol promote tissue repair in a rat model of spinal cord injury. **Journal of neurotrauma**,  
2634 v.28, n.11, Nov 01, p.2349-2362. 2011.
- 2637 RUSSO, R.C. **Efeito da administração do antagonista de receptor CXCR2 no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina**. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005. 1-79 p.
- 2640
- 2643 RYMAN-RASMUSSEN, J.P.; CESTA, M.F.; BRODY, A.R.; SHIPLEY-PHILLIPS, J.K.; EVERITT, J.I.; TEWKSBURY, E.W.; MOSS, O.R.; WONG, B.A.; DODD, D.E.; ANDERSEN, M.E. & BONNER, J.C. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. **Nature nanotechnology**, v.4, n.11, Nov 01, p.747-751. 2009.
- 2646 SAGER, T.M.; PORTER, D.W.; ROBINSON, V.A.; LINDSLEY, W.G.; SCHWEGLER-BERRY, D.E. & CASTRANOVA, V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. **Nanotoxicology**, v.1, n.2, Feb, p.118-129.  
2649 2007.
- 2652 SAITO, R.; DRESSELHAUS, G. & DRESSELHAUS, M. Physical properties of carbon nanotubes. 1998.

- 2655 SCHRODER, K. & TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v.140, n.6, Apr 19, p.821-832. 2010.
- 2658 SCRIVENS, W.A.; RAWLETT, A.M. & TOUR, J.M. Preparative Benchtop Enrichment of C(60), C(70), and the Higher Fullerene Allotropes Using a Brominated Polystyrene Stationary Phase. **The Journal of organic chemistry**, v.62, n.8, May 18, p.2310-2311. 1997.
- 2661 SEMERARO, F.; AMMOLLO, C.T.; MORRISSEY, J.H.; DALE, G.L.; FRIESE, P.; ESMON, N.L. & ESMON, C.T. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. **Blood**, v.118, n.7, Aug 18, p.1952-1961. 2011.
- 2667 SHVEDOVA, A.A. & KAGAN, V.E. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. **Journal of Internal Medicine**, v.267, n.1, p.106-118. 2010.
- 2673 SHVEDOVA, A.A.; KISIN, E.; MURRAY, A.R.; JOHNSON, V.J.; GORELIK, O.; AREPALLI, S.; HUBBS, A.F.; MERCER, R.R.; KEOHAVONG, P.; SUSSMAN, N.; JIN, J.; YIN, J.; STONE, S.; CHEN, B.T.; DEYE, G.; MAYNARD, A.; CASTRANOVA, V.; BARON, P.A. & KAGAN, V.E. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. **American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology**, v.295, n.4, Oct 01, p.L552-65. 2008.
- 2679 SINGH, R.; PANTAROTTO, D.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; KLUMPP, C.; PRATO, M.; BIANCO, A. & KOSTARELOS, K. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.9, Mar 28, p.3357-3362. 2006.
- 2682 SMART, S.; CASSADY, A.; LU, G. & MARTIN, D. The biocompatibility of carbon nanotubes. 2005.
- 2688 SOARES, J.S. **Estudo da interação de Nanotubos de Carbono com substrato de quartzo cristalino**. Física, Universidade Federal e Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2011. 1-111 p.
- 2694 The dose makes the poison. **Nature nanotechnology**, v.6, n.6, Jul, p.329. 2011.
- 2697 UO, M.; AKASAKA, T.; WATARI, F.; SATO, Y. & TOHJI, K. Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials. **Dental Materials Journal**, v.30, n.3, p.245-263. 2011.
- 2700 VAN KUPPEVELT, T.H.; ROBBESOM, A.A.; VERSTEEG, E.M.; VEERKAMP, J.E.; VAN HERWAARDEN, C.L. & DEKHUIJZEN, P.N. Restoration by vacuum inflation of original alveolar dimensions in small human lung specimens. **The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v.15, n.4, May, p.771-777. 2000.
- 2703

- 2706 VIPPOLA, M.; FALCK, G.; LINDBERG, H.; SUHONEN, S.; VANHALA, E.; NORPPA, H.; SAVOLAINEN, K.; TOSSAVAINEN, A. & TUOMI, T. Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing. **Human & Experimental Toxicology**, v.28, n.6-7, Sep 15, p.377-385. 2009.
- 2709 WANG, C.-H.; CHIOU, S.-H.; CHOU, C.-P.; CHEN, Y.-C.; HUANG, Y.-J. & PENG, C.-A. Photothermolysis of glioblastoma stemlike cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, Jul 08. 2010.
- 2712
- 2715 WANG, L.; MERCER, R.R.; ROJANASAKUL, Y.; QIU, A.; LU, Y.; SCABILLONI, J.F.; WU, N. & CASTRANOVA, V. Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. **Journal of toxicology and environmental health Part A**, v.73, n.5, p.410-422. 2010.
- 2718
- 2721 WANG, X.; XIA, T.; NTIM, S.A.; JI, Z.; GEORGE, S.; MENG, H.; ZHANG, H.; CASTRANOVA, V.; MITRA, S. & NEL, A.E. Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells. **ACS nano**, v.4, n.12, Dec 28, p.7241-7252. 2010.
- 2724
- 2727 WEAVER, C.T. & HATTON, R.D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. **Nature Reviews Immunology**, v.9, n.12, Dec 01, p.883-889. 2009.
- 2730 WÖRLE-KNIRSCH, J. & PULSKAMP, K. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays - Nano Letters (ACS Publications). **Nano letters**. 2006.
- 2733 WYNN, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **The Journal of clinical investigation**, v.117, n.3, Apr 01, p.524-529. 2007.
- 2736 WYNN, T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. **The Journal of experimental medicine**, v.208, n.7, Jul 04, p.1339-1350. 2011.
- 2739 YAMASHITA, K.; YOSHIOKA, Y.; HIGASHISAKA, K.; MORISHITA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJIMURA, M.; KAYAMURO, H.; NABESHI, H.; YAMASHITA, T.; NAGANO, K.; ABE, Y.; KAMADA, H.; KAWAI, Y.; MAYUMI, T.; YOSHIKAWA, T.; ITOH, N.; TSUNODA, S.-I. & TSUTSUMI, Y. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. **Inflammation**, v.33, n.4, Aug 01, p.276-280. 2010.
- 2742
- 2745 ZHOU, R.; YAZDI, A.S.; MENU, P. & TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v.469, n.7329, Feb 13, p.221-225. 2011.
- 2748
- 2751 [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biosph%C3%A8re\\_Montr%C3%A9al\\_CA.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biosph%C3%A8re_Montr%C3%A9al_CA.jpg) (visitado em 27 de janeiro de 2012)
- 2754 <http://www.abdi.org.br/website/artigos.asp?id=318> (Visitado em 09 de janeiro de 2012)
- <http://www.britishmuseum.org/> (visitado em 27 de janeiro de 2012)

- 2757 [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=15](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=15) (acessado em 25 de janeiro de 2012)
- 2760 <http://www.nanocyl.com/en/Products-Solutions/Products/Research-Grades> (acessado em 15 de novembro de 2011)
- 2763 <http://www.nanotechproject.org/> (visitado em 29 de janeiro de 2012)