

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 22/02/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

EDSON JOSÉ COMPARETTI

**“AÇÃO DO PACLITAXEL TRANSPORTADO POR NANOTUBOS DE CARBONO
SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO”**

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

BOTUCATU - SP

2017

EDSON JOSÉ COMPARETTI

**“AÇÃO DO PACLITAXEL TRANSPORTADO POR NANOTUBOS DE CARBONO
SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Campus Botucatu, para obtenção do Título de
Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno.
Coorientador: Valber de Albuquerque Pedrosa.

BOTUCATU

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Comparetti, Edson José.

Ação do paclitaxel transportado por nanotubos de carbono sobre células de câncer prostático / Edson José Comparetti. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Coorientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

Capes: 90300009

1. Próstata - Câncer. 2. Paclitaxel. 3. Nanotubos de carbono. 4. Biotecnologia.

Palavras-chave: Câncer prostático; Nanocarreadores; Nanotubos de carbono; Paclitaxel.

Dedico este trabalho a meus amados pais, José e Florinda, e ao meu querido irmão, Edmilson, por sempre me apoiarem em minhas decisões e, acima de tudo, pelo exemplo de simplicidade e dedicação a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno, meu orientador, pelo seu exemplo como professor universitário e pesquisador, por me receber em seu laboratório tão bem, pelos novos ensinamentos que me estimularam a crescer profissionalmente, pela sua coragem e dedicação a um novo projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa, meu coorientador, por me mostrar o caminho para a elaboração e execução do projeto de mestrado, por me receber em seu laboratório, pelos conselhos, auxílios e inspiração na vida acadêmica.

A Dra. Graziela Romagnoli pelo auxílio na execução do projeto, pela tranquilidade e clareza em todos os ensinamentos transmitidos, pela amizade e inspiração.

A Carolina Gorgulho por ter sido, sempre, a primeira a me ensinar as técnicas desenvolvidas no laboratório, pelos auxílios teóricos e experimentais, pela amizade e inspiração.

A Carol Rodrigues pelos ensinamentos transmitidos, pela inspiração e, principalmente, pela amizade.

A Lucas Recco, colega de graduação e mestrado, pelos auxílios nos experimentos, pelo apoio passado durante os períodos mais turbulentos, pelas horas de conversas, pela inspiração e, principalmente, amizade.

A todos os colegas do laboratório de Imunologia de Tumores, Sophia, Raquel, Jofer, Angélica e Flavia, pela ajuda nos experimentos, amizade e inspiração.

Aos meus amigos João Paulo Ruiz e Marcel Ferreira, que me motivaram durante o mestrado.

Ao Instituto de Biociências (IB) e a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), pela oportunidade de fazer o curso.

Aos técnicos administrativos do departamento de Microbiologia e Imunologia, Aline, Ana, Rafael, Ivana, Larissa, Luiz Alquati e Luiz Severino, pela ajuda e amizade.

Aos doadores de sangue que possibilitaram a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo, processo nº 2014/26032-9.

A todos amigos e colegas de graduação e mestrado que compartilharam comigo um pouco de si.

“Conheço muitos que não puderam quando deviam, porque não quiseram quando podiam”.

François Rabelais.

Resumo

A nanomedicina é o ramo da nanotecnologia que investiga a aplicação de novos materiais para a área médica e biomédica. Os nanotubos de carbono (CNT) são conhecidos pela sua aplicação em diversas áreas de pesquisas, como nos campos óptico e eletrônico. No campo biomédico, os CNT podem auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças, como por exemplo: no desenvolvimento de novos biossensores e entrega controlada de drogas às células doentes. Neste cenário, apresentamos uma revisão literária dos CNT aplicados na área biomédica, demonstrando os principais avanços e enfatizando seu potencial de uso como nanocarreador de agentes antineoplásicos para células tumorais. Na sequência, apresentamos os dados experimentais de um estudo em que CNT foram modificados para transportar paclitaxel (PTX) mimetizados com anticorpos anti-PSMA para endereçá-los as células de câncer prostático humano. Nossos resultados demonstram a eficiência da metodologia empregada para a incorporação de paclitaxel nos CNT, bem como para o revestimento com anticorpos monoclonais. Mais importante foi a observação de que a preparação final contendo PTX e o anticorpo anti-PSMA (CNT-PTX-Ab) mostrou-se mais eficiente que o PTX puro em atacar células tumorais LNCaP. Ao final, apresentamos os dados de um estudo adicional em que os CNT carregados com PTX foram submetidos com glicose. Considerando que células tumorais apresentam metabolismo mais elevado que as células normais hipostenizamos que o açúcar poderia favorecer sua interação com essas células. Nossos resultados mostram que a glicose melhorou discretamente a entrega do PTX para as células tumorais, porém a interação com monócitos e células dendríticas também foi exacerbada pela presença de glicose, provocando alterações fenotípicas e funcionais nessas células.

Lista de abreviaturas e siglas

7AAD - 7-Aminoactinomycin D

Alexa 488 - Alexafluor 488

ANOVA – Análise de variância

APC – alofocianina

APC-H7 - alofocianina-cyanine tandem 7

CFSE - Carboxifluoresceína succinimidyl ester

CNT – Nanotubo de carbono

DCs - Células dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

EDC - 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FTIR - Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier

GLI - Glicose

iDC - Células dendríticas imaturas

mDC - Células dendríticas maduras

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MLR - Reação mista de leucócitos

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NHS - N-Hidroxisuccinimida

PBMCs - Célula mononuclear do sangue periférico

PE - ficoeritrina

PeCy7 - ficoeritrina-cianine tandem 7

PEI – Polietilenimina

PercP - clorofila peridina

PSMA - Antígeno de membrana específico da próstata

PTX - Paclitaxel

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Sumário

CAPÍTULO 1: APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO COMO FERRAMENTA NO COMBATE AO CÂNCER -----	9
CAPÍTULO 2: TRANSPORTE DE PACLITAXEL POR NANOPARTÍCULAS DE CARBONO REVESTIDAS COM ANTICORPO ANTI-PSMA PARA CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO -----	32
CAPÍTULO 3: ENTREGA DE PACLITAXEL POR NANOTUBOS DE CARBONO REVESTIDOS COM GLICOSE A CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO E CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES -----	79
CONSIDERAÇÕES FÍNAIS -----	113

CAPÍTULO 1: APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO COMO FERRAMENTA NO COMBATE AO CÂNCER

Resumo

Nanotubos de carbono (CNT) são estruturas formadas por folhas de grafeno enroladas, com comprimento e diâmetro variáveis. Suas características físico-químicas como resistência a tração, boa condutividade térmica e elétrica, permitem sua aplicação em diversas áreas de pesquisas. No presente texto, apresentamos dados da literatura que aprovam a aplicação dos CNT na área biomédica, como nanosensores para o diagnóstico ou como nanocarreadores para o transporte de fármacos, enfatizando o potencial de uso dessas nanoestruturas no combate ao câncer.

Abstract

Carbon nanotubes (CNT) are nanostructures synthesized with graphene sheets, which walls have a spiral shape with varied length and thickness. Their physicochemical feature such as resistance to tension, thermal and electrical conductivity, allow their application in several fields. In this overview we present evidence supporting the applicability of CNT in biomedical practice and as nanosensors for diagnostics, as nanocarriers for drug transportation, emphasizing their potential to fight câncer.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Agentes antitumorais transportados por nanopartículas para células alvo.....14

Tabela 2: Agentes antineoplásicos transportados por nanotubos de carbono.....16

A nanotecnologia é uma das áreas com maior volume de pesquisa na atualidade, utilizando o conhecimento da química, física, ciência dos materiais e biotecnologia para o desenvolvimento de novos materiais (1). Pode ser definida como uma engenharia de sistemas funcionais, manipulável em escala atômica, molecular e supramolecular, com dimensão de trabalho de 1 a 100 nanômetros (2). Uma das áreas de investigação da nanotecnologia é o desenvolvimento e aplicação de nanopartículas nos campos biomédico, óptico e eletrônico (3).

A nanomedicina é o ramo da nanotecnologia que se dedica ao desenvolvimento de novos materiais destinados às aplicações médicas e biomédicas para auxiliar no diagnóstico (ressonância magnética, raios-X e ultra-som) e no tratamento de doenças (hipertermia, libertação de fármacos e radicais livres). As principais classes de nanopartículas pesquisadas com potencial uso clínico são lipossomos (4), nanopartículas poliméricas (5), dendrímeros (6), quantum dots (7), nanopartículas metálicas (8) e nanopartículas de carbono (9). Assim, em linhas gerais, lipossomos são partículas esféricas (nanométricas) formada por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, nanopartículas poliméricas são nanocapsulas ou nanoesferas composta por uma matriz polimérica em sua estrutura. Os dendrímeros são nanopartículas com estrutura polímerimérica composta de um núcleo e cadeias ramificadas ao redor, enquanto os quantum dot são nanopartículas cristalinas com características semicondutoras, capaz de emitir uma colorações específica de acordo com seu tamanho. Outras nanopartículas podem ser construídas com elementos diversos, como é o caso dos nanotubos de carbono e as nanopartículas de ouro. Um dos aspectos mais importantes das nanopartículas é a possibilidade de manipulação das estruturas, de modo que permita seu “endereçamento” a um tecido ou órgão, através de técnicas de mimetização de sua superfície (10). A aplicabilidade dessas partículas é também dependente de seu tamanho que determina sua capacidade de movimento no interior dos órgãos e tecidos, de modo que nanopartículas menores que 10 nm, como certas drogas formadas por pequenas moléculas, são rapidamente eliminadas pelo rim, enquanto partículas na faixa de 10 nm a 100 nm viajam pela corrente sanguínea (11, 12) e podem se depositar em locais específicos, desde que adequadamente endereçadas (7).

Assim, estudos prévios demonstram que nanocarreadores podem transportar ácidos nucleicos, proteínas e fármacos para as células de interesse (13) e seu endereçamento pode ser feito pela fixação de biomarcadores (característicos de cada classe celular) à superfície das estruturas, estabelecendo maior especificidade pelo tecido alvo (13, 14). Na Tabela 1 podem ser observados exemplos de diferentes tipos de nanopartículas mimetizadas com marcadores diversos, objetivando seu endereçamento e transporte de moléculas com ação antitumoral.

Tabela 1: Agentes antitumorais transportados por nanopartículas para células alvo.

Nanopartículas	Agente atitumoral	Objetivo	Célula alvo	Referência
Lipossomos	Docetaxel	Entrega de antioxidantes e docetaxel por lipossomos em células cancerígenas.	MCF-7 HepG-2 PC-3	(15)
	Gefitinib	Transporte de gefitinib conjugado com peptídeos capazes de transpor células endoteliais do cérebro e interagir com adenocarcinoma de pulmão.	bEnd.3 PC9	(16)
	STAT3 siRNA	Transporte de curcumina e siRNA de STAT3 sobre carcinoma de pele.	A431	(17)
Nanopartículas de ouro	Doxorrubicina	Transporte de quimioterápico por nanocarreadores conjugados com peptídeos capazes de transpor a membrana celular.	HeLa A549 3T3-L1	(18)
	-----	Efeitos das nanopartículas de ouro sobre a ação inflamatória e imunomodulatória de células mononucleares.	Monócitos	(19)
	Bcl-2 siRNA	Nanopartículas de ouro complexadas com peptídeos e siRNA de Bcl-2 para avaliar sua interação com glioblastoma.	Glioblastoma	(20)
Quantum dots	Oligonucleotídeos de EpCAM e Muc1	Conjugação de quantum dots com oligonucleotídeos de EpCAM e Muc1 para detecção de célula metastática e análise por imagem de fluorescência no infravermelho próximo.	MDA-MB-231 Kato III	(21)
	Paclitaxel	Avaliar o potencial dos quantum dots exercendo simultaneamente a função de diagnóstico e carreador de agente antineoplásico.	HepG2	(22)
	Doxorrubicina	Carregamento de quantum dots de grafeno com quimioterápico e análise de interação com células por fluorescência e imagem de ressonância magnética.	HeLa	(23)
Dendrímeros	TWIST siRNA	Nanopartículas conjugadas com siRNA a fim de impedir a expressão de marcadores de transição de células epiteliais para mesenquimais, avaliando seus resultados na prevenção de metástase de células de câncer de ovário e sua sensibilização a quimioterápico.	A2780R Ovcar8	(24)
	Maltose	Verificar a ação imunomodulatória de dendrímeros revestidos com maltose em células mononucleares.	THP-1	(25)

Entre as nanopartículas sintetizadas a partir de elementos orgânicos, destacaremos os nanotubos de carbono (CNT), por conta de seu grande potencial de inovação científica e tecnológica. Os CNT são estruturas formadas por folhas de grafeno “enroladas”, podendo ser classificados como nanotubos de paredes simples (SWCNT - Single Wall Carbon Nanotubes), quando apresenta uma única camada de grafite ou de múltiplas paredes (MWCNT - MultiWall CarbonNanotubes), quando é formado por mais de uma camada (26). O diâmetro e o comprimento dos SWCNT podem variar entre 0,5-3,0 nm e 20-1000 nm, respectivamente, enquanto as dimensões dos MWCNT estão entre 1,5-100 nm e 1-50 μm (10). Sua forma cilíndrica característica é resultante das ligações covalentes (sp^2) formadas entre os átomo (27) e essas partículas apresentam uma força extraordinária, com resistência à tração de até 100 giga pascal (GPa) e densidade de 1,3 a 1,4 g/cm^3 (28, 29). Outras propriedades como a boa condutividade térmica e elétrica (30, 31) permitem sua aplicação em diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento de novos dispositivos. Assim como outros nanomateriais, os CNT podem ser naturalmente encontrados no ambiente, principalmente em regiões que tiveram (ou tem) grande atividade vulcânica (32, 33). Os CNTs se mostram potencialmente úteis na área biomédica para entrega controlada de drogas (13) às células doentes, minimizando sua ação em tecidos saudáveis do corpo e evitando os efeitos colaterais usualmente provocados pelo tratamento. Assim, CNT tem sido utilizados na detecção de células cancerosas presentes na corrente sanguínea. Conjugados com anticorpos monoclonais, eles são utilizados no desenvolvimento de biossensores para detecção de marcadores tumorais no organismo, constituindo-se em uma alternativa barata e rápida para diagnosticar o câncer ou detectar sua recidiva (34, 35).

Esses nanotubos também têm sido avaliados como veículos para administração dirigida de drogas no tratamento do câncer, graças à possibilidade de manipulação para aumentar sua seletividade celular (36, 37). As características acima citadas tornam bastante atrativas a possibilidade de uso dos CNT na terapia antitumoral, superando dificuldades usuais dos tratamentos contra o câncer. Por exemplo, quando quimioterápicos conseguem entrar nas células doentes, há possibilidade deles serem ejetados por bombas celulares, antes que comecem a agir, como um mecanismo natural de resistência (38). Em contraste, as nanopartículas penetram na célula por endocitose, processo que cria uma bolsa de membrana celular em torno do objeto, levando-o para dentro da célula e protegendo-o dos mecanismos de bombas celulares (39-41).

Tabela 2: Agentes antineoplásicos transportados por nanotubos de carbono.

Material	Agentes antineoplásicos	Célula-alvo	Resultado	Referência
SWCNT	Paclitaxel	MCF-7	PTX conjugados com SWNT revestidos com lipídeos foram capazes de inibir o desenvolvimento de células tumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(42)
			SWCNT complexado com albumina de soro humano e PTX apresentou maior efeito citotóxico que o próprio quimioterápico.	(43)
			SWCNT-Paclitaxel inibe a proliferação de células MCF-7 de forma dependente da concentração e do tempo.	(44)
SWCNT	Doxorrubicina	HepG2 HeLa	SWCNT-DOX possibilitou maior captação do quimioterápico pelas células.	(45)
SWCNT	Doxorrubicina	K562R	CNT complexado com DOX e anticorpo interrompeu a proliferação de células leucêmicas (K562R) e potencializou a ação do quimioterápico.	(46)
SWCNT	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN38)	HCT116 HT29	A conjugação de CNT com anticorpos anti-C225 demonstrou ser eficaz no transporte de quimioterápicos para células EGFR positivas.	(47)
MWCNT SWCNT	Carboplatina	DU145, PC-3, A498, EJ28	Nanotubos são capazes de serem complexados com carboplatina e reduzir o crescimento de células cancerosas com maior eficiência do que o quimioterápico puro.	(48)
MWCNT	Doxorrubicina	SH-SY5Y, HT-29, HepG2	O tratamento possibilitou a redução da proliferação celular em todas linhagens de células tumorais de modo pH dependente, com maior liberação do fármaco a pH 5,3.	(49)
MWCNT	Paclitaxel	MKN-45	MWCNT-PTX promovem apoptose nas células, potencializando a ação do quimioterápico.	(50)
MWCNT	Docetaxel	A549	As nanopartículas carregadas com docetaxel apresentou maior citotoxicidade, com maior número de morte celular por apoptose.	(51)
MWCNT	Cloreto de platina (IV)	MCF-7 A2780	A ação de quimiossensibilizador e cloreto de platina carregados simultaneamente por CNT aumentou a citotoxicidade dos componentes nas linhagens de células tumorais.	(52)

As dimensões dos nanotubos de carbono permitem que sejam conjugados com mais de uma estrutura, possibilitando tanto o carregamento de grandes quantidades de fármacos quanto a conjugação de moléculas responsáveis pelo seu endereçamento celular. Nesse sentido, foi demonstrado, em modelos de estudos com células tumorais, que CNT podem ser carregados com quimioterápicos e controlar liberação do fármaco dentro das células doentes (53). Na Tabela 2 destacamos alguns estudos em que CNT foram utilizados como nanocarreadores de agentes antineoplásicos.

As propriedades dos CNTs permitem aplicar técnicas físico-químicas menos prejudiciais aos pacientes, como tratamentos fototérmico e fotodinâmico. CNTs apresentam propriedades térmicas quando exposto a comprimentos de onda na faixa do infravermelho (54) e seu aquecimento possibilita o uso simultâneo de tais estruturas no diagnóstico e tratamento de melanomas. Zhang H. et al (55) observou ser possível carrear fármacos e utilizar as propriedades térmicas dos CNT para tratar células tumorais (*in vitro e in vivo*) por hipertermia. Seus resultados demonstraram que o tratamento por fototerapia contribui para potencializar o efeito antitumoral das nanopartículas, não afetando o transporte do fármaco e apresentando baixa toxicidade de irradiação laser nos tecidos saudáveis. Para direcionar CNT às células de carcinoma hepatocelular, as nanopartículas foram conjugadas com albumina humana para facilitar sua internalização via receptor Gp60 de células HepG2 (56). Os resultados demonstram a afinidade das nanopartículas pelo receptor, resultando em maior captação dos CNT e aumento de morte celular por ablação térmica, após o tratamento com laser. A eficácia da fototerapia com CNT e seu baixo efeito citotóxico no organismo foi demonstrado também *in vivo*, por exposição à luz de infravermelho próximo, nos animais tratados com SWCNT observou-se a destruição de células do sítio tumoral, apresentando índice de recidiva menor que os grupos controle (57).

Consciente do potencial dos CNT no desenvolvimento de novas estruturas e sabendo da eficácia desse nanomaterial no transporte de quimioterápico, Wu H. et al (58) investigou os MWCNT como agentes carreadores de doxorubicina. Ao acoplar ferrita de cobalto na superfície de CNT, observou sua capacidade de produzir imagens por ressonância magnética (RM). O complexo MWCNT/CoFe₂O₄ foi capaz de, simultaneamente, gerar imagens de RM em células de câncer de colo de útero (HeLa) e apresentar grande potencial de citotoxicidade da doxorubicina acoplada. Do mesmo modo, observou-se *in vivo*, o potencial terapêutico dos nanotubos de carbono na geração de imagens por ressonância magnética (RM) e tratamento do câncer por radioisótopos e fototerapia (59). Os autores acoplaram polidopamina (PDA) aos CNT, um polímero capaz de melhorar a qualidade de imagens de RM pela afinidade a Mn²⁺, e

o conjugaram com radionuclídeo ^{131}I . A presença do radionuclídeo nas nanopartículas tornou as células mais sensíveis aos efeitos da fototerapia enquanto a conjugação com PDA na nanoplataforma, permitiu a geração de imagens por RM, demonstrando o potencial dos CNT no diagnóstico e tratamento do câncer.

As pesquisas com CNT na área biomédica ganharam espaço nos últimos anos e os bons resultados permitiram estudar sua aplicação nas propostas de terapia gênica do câncer. Por exemplo, a possibilidade de entregar genes sem limitação de tamanho fez dos CNT uma ferramenta de uso na terapia gênica, sendo utilizados como vetores na entrega de plasmídeo, RNA de interferência (siRNA) e micro RNA (miRNA) para células doentes. Alidori S. et al (60) demonstraram a possibilidade de funcionalização dos CNTs com sequências de oligonucleotídeos (DNA e RNA). Estudando a estabilidade dos CNTs em condições fisiológicas, a afinidade das ligações e o processo de entrega do vetor, os autores demonstram a influência do pH sobre a carga superficial da nanopartícula e sua ação no processo de construção do vetor, contribuindo para seu uso na terapia gênica. Wu Y. et al (61) investigaram o transporte de cadeias de DNA por CNT e observaram que, diferente de oligonucleotídeos livres, os vetores protegem o material genético de clivagens enzimática e da interferência de proteínas de ligação de ácido nucleico, proporcionando melhor estabilidade e mantendo a função da fita por maior tempo no citoplasma. Nas células tumorais, o silenciamento de determinados genes permite aumentar a eficácia de tratamentos, a utilização de iRNA e siRNA inibem a síntese de proteínas importantes para sobrevivência das células. Para direcionar a ação dessas moléculas sintéticas, CNT foram conjugados com siRNA sobre células de câncer de colo de útero (HeLa), demonstrando inibir a expressão de proteína de modo mais eficaz que outros agentes de transfecção (62). A complexação de CNT com siRNA de BCL91 (proteína presente em câncer colorretal e de mama) e aptâmeros com afinidade a molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM) inibe a expressão da proteína em células de adenocarcinoma de mama (63). *In vivo*, observou-se em camundongos, a melhora do tratamento com siRNA de PLK1 (proteína quinase responsável por regular a formação do fuso mitótico) carregado por CNT e sua relação direta com o aumento da retenção nas células tumorais (64).

Internalização e toxicidade das nanopartículas.

Como visto, as nanopartículas são capazes de entregar diversas estruturas para células, mas, diferente dos elementos carregados, sua internalização pode ocorrer por mais de uma via. Características estruturais (como tamanho e formato), presença de grupos funcionais (polímeros e proteínas) e concentração, influenciam na captura das nanopartículas (65). O modo de internalização pode se diferenciar de acordo com a linhagem celular; assim, algumas células do sistema imune (como monócitos e neutrófilos) são capazes de reconhecer as nanopartículas e capturá-las por via fagocítica, enquanto células tumorais as capturam por difusão ou endocitose (65).

Assim como as demais nanopartículas, o tamanho e a presença de materiais adsorvidos na superfície influenciam na captura dos CNTs pelas células. A hidrofilicidade superficial dos MWCNTs interfere na sua interação com a membrana celular e nanopartículas mais dispersas em solução aquosa entram com maior facilidade nas células, enquanto a captura de CNT com poucos grupos funcionais é reduzida consideravelmente (66). A principal forma de internalização dos MWCNT é por via endocítica mediada por clatrina (proteína necessária na formação da vesículas endossomais) (67). Células tumorais HeLa capturam os CNT via receptor específico, um processo de transporte ativo por via endocítica, seguido pelo seu transporte para o retículo endoplasmático e sua liberação no citoplasma (67). Células epiteliais brônquicas normais tem um mecanismo de endocitose dos MWCNT e sua captura pode ocorrer preferencialmente via clatrina, mas outras vias, como macropinocitose, também contribuem para sua internalização (68). Quando bloqueado o suplemento de energia nas células, os CNT são capazes de entrar (em menor quantidade) por translocação da membrana plasmática, uma via que não consome energia e confirma as várias possibilidades de internalização dos CNTs (69). As nanopartículas carregadas com quimioterápicos são internalizadas por via endocítica, a fusão dos endossomos (pH 7,4) com os lisossomos (fagolisossomos) promove a redução de pH (4,8), desencadeando a liberação do fármaco. Assim, a entrega do fármaco através dos nanotubos produz níveis mais elevados dentro da célula do que sua entrega livre (70). Assim, os CNT mimetizados com estruturas que apresentem afinidade por células tumorais poderiam interagir de modo diferenciado por essas células, permitindo o endereçamento de agentes terapêuticos (71, 72), resgatando a ideia seminal de Paul Ehrlich, de desenvolvimento dos “projéteis mágicos” (ainda que à época ele se referisse à simples conjugação de toxinas a anticorpos).

A toxicidade produzida pelas nanopartículas variam de acordo com materiais usados em sua síntese, suas características estruturais e condições experimentais, como tipo de linhagem

celular a ser avaliada e o tempo de exposição ao nanocomposto (73). As pesquisas sobre a toxicidade dos nanotubos de carbono, *in vitro* e *in vivo*, são intensas, mas inconclusivas. Nanotubos suficientemente pequenos podem atravessar a membrana celular sem provocar lesão tecidual (74), porém algumas particularidades como tamanho, área de superfície e pureza influenciam seu grau de risco (75, 76). Há evidências de que, para evitar efeitos tóxicos e inflamatórios no organismo, enzimas celulares fazem sua biodegradação (77, 78) e estudos com camundongos demonstram que eles são excretados gradualmente através da via biliar (79). Não há efeitos tóxicos generalizados, mas sua exposição crônica pode gerar alterações bioquímicas que revelam toxicidade nos pulmões, representando um risco para a saúde humana (80). O recobrimento das nanopartículas com polímeros biocompatíveis com as células torna-as hidrossolúveis (10) e diminui sua toxicidade (81).

Danos no DNA e morte celular por apoptose são os principais efeitos citotóxicos observados em tratamentos com altas doses de CNT (82). A presença desse nanomaterial pode induzir a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio e levar a danos no material genético e perturbar a função mitocondrial (83). A genotoxicidade é alterada quando as nanopartículas entram individualmente nas células ou em um emaranhado de nanotubos, sendo que individualmente provocam ruptura do material genético e a presença de emaranhados reduz sua toxicidade (84). Sasaki T. et al (85) observaram efeitos genotóxicos causados por MWCNT e concluíram que as nanopartículas são capazes de induzir aberrações cromossômicas como poliploidia. Jackson P. (86) et al demonstraram em células epiteliais de pulmão de hamster que MWCNT com diferentes funcionalizações não induzem citotoxicidade e apenas grupos de nanopartículas sem modificação apresentam níveis aumentados de danos ao DNA. Estudos realizados em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) e ensaios em fibroblastos de pulmão de hamster demonstraram que os danos no material genético produzidas por espécies reativas de oxigênio está relacionada com a presença de grupos carboxila nas nanopartículas (87) e suas propriedades físico-químicas (88).

Atualmente, o desenvolvimento de nanocompostos para futuro uso clínico está vinculada às pesquisas de ação citotóxica e imunomoduladora das nanopartículas nas células do sistema imune. Por apresentar efeitos citotóxicos, a presença das nanopartículas no organismo estimula a resposta de células mononucleares e polimorfonucleares. MWCNT em altas concentrações induzem a produção de espécies reativas de oxigênio por leucócitos do sangue periférico, com conseqüente dano ao material genético e morte celular (89). Em concentrações não tóxicas, as nanopartículas não prejudicam a viabilidade celular e nem a

linfoestimulação (90), mas aumentam a produção de IFN- γ e TNF- α interferindo em sua função (91).

Altas concentrações de CNTs podem diminuir a viabilidade celular de monócitos humanos e induzir sua diferenciação em macrófagos (92). A geometria da nanopartícula influencia no processamento e resposta inflamatória nas células mononucleares, aumentando a expressão de genes que codificam citocinas IL-1 β e IL-6 (93). Meunier et al (94) comprovou que a produção de citocinas pró-inflamatórias está ligada à ativação da caspase-1 e inflamassoma Nlrp3, demonstrando que a produção de IL-1 β e IL-18 requer acidificação lisosomal (decorrente da fagocitose dos CNTs) e fluxo de íons potássio para fora da célula, descartando a participação de espécies reativas de oxigênio nesse processo inflamatório. Pesquisas mais recentes apontam redução do perfil pró-inflamatório quando proteínas do sistema complemento interagem com a superfície dos nanotubos (95). A presença de tais proteínas favorece a captura dos CNT por monócitos e macrófagos, produzindo uma resposta anti-inflamatória pela redução da produção de TNF- α e IL-1 β (96).

Nos macrófagos, os CNT puros produzem espécies reativas de oxigênio e danos no material genético que podem levar a morte celular (97). Quando funcionalizadas com polímeros, a captura das nanopartículas é reduzida, produzindo menor estresse oxidativo e morte celular (98). Quando fagocitados, a baixa degradação dos CNT pelos macrófagos produz resposta inflamatória. Pesquisas apontam que a eliminação dos CNT ocorre pela ativação de Nox2 oxidase (uma isoforma de NADPH oxidase), desencadeando a produção de espécies reativas de oxigênio responsáveis pela degradação das nanopartículas (99).

Pela capacidade de carrear diversas estruturas, os CNTs podem facilitar a captura de antígenos pelas células dendríticas e potencializar sua resposta imune (100). Por exemplo, nanopartículas conjugadas com proteínas específicas de células tumorais são capturadas pelas DCs que processam essas proteínas e expõem os peptídeos gerados em associação com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (101). A presença de MWCNT puro durante o processo de diferenciação de monócitos em células dendríticas pode alterar a função das DCs (102), mas quando já diferenciadas os CNTs não interferem no seu fenótipo (103). A expressão de marcadores de maturação (como HLA-DR, CD86 e CD80) pode ser alteradas pelos materiais complexados na superfície dos CNT, permitindo o desenvolvimentos de nanopartículas que modulem a ação das DCs (103). Experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados por Faria et al (104) demonstraram a aplicação dos CNT complexados com antígenos específicos como veículo estimulatório de DCs, favorecendo a apresentação de antígenos e a linfoproliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺.

O desenvolvimento de nanopartículas capazes de circular o maior tempo possível pelo organismo, transpondo as barreiras fisiológicas sem causar toxicidade aos tecidos, é um dos grandes desafios da nanomedicina. Os primeiros testes *in vivo* realizados com CNTs mostraram que as nanopartículas podem circular pela corrente sanguínea de camundongos, com uma parcela do material sendo eliminada pela urina e outra ficando retida em órgão como fígado, baço, rins e pulmão (105, 106). Albini et al (107) demonstraram a formação de agregados de CNT nos principais órgãos de camundongos, semanas após a exposição, ocasionando aumento de células CD68⁺ e deposição de proteínas amilóides nos tecidos. Altas doses de CNT provocam aumento da massa de órgãos como fígado, baço e pulmão (108). Nos pulmões, o acúmulo de CNT pode produzir processos inflamatórios com expressão de TNF- α nas células, fibrose e formação de colágeno nas lesões (109). Em 2016 foram realizados pela primeira vez testes com CNTs em macacos, Alidori et al (110) observaram que a maioria das nanopartículas administradas por via intravenosa foi rapidamente eliminada pela urina e o restante depositando-se no fígado, com mudanças patológicas não detectadas nos tecidos. O tamanho e a dispersão das nanopartículas influenciam na circulação pelo organismo. Quando incorporados com polímeros, a toxicidade dos CNT *in vivo* diminui, impedindo sua retenção nos órgãos, aumentando seu tempo de circulação e a quantidade de nanopartículas excretadas (111).

CNTs apresentam características que podem auxiliar o combate ao câncer, porém, para viabilizar sua aplicação clínica, são necessárias mais pesquisas que comprovem sua segurança e efetividade. Como benefício, as nanopartículas permitiriam que simples modificações ampliassem sua aplicação a diversas linhagens tumorais, podendo ser uma abordagem econômica viável. Acreditamos que, como nanocarreador, os CNTs podem transportar quimioterápicos a células específicas, diminuindo os efeitos colaterais do fármaco no organismo e aumentando sua efetividade, tornando-se um promissor instrumento no tratamento de doenças.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian journal of medical research*. 2009;130(6):689-701.
2. Rauscher H, Sokull-Kluttgen B, Stamm H. The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology*. 2013;7(7):1195-7.
3. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *The New England journal of medicine*. 2010;363(25):2434-43.
4. Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent developments of liposomes as nanocarriers for theranostic applications. *Theranostics*. 2016;6(9):1336.
5. Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle technologies for oral drug delivery. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(10):1605-10.
6. Madaan K, Kumar S, Poonia N, Lather V, Pandita D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2014;6(3):139-50.
7. Liu J, Erogbogbo F, Yong KT, Ye L, Liu J, Hu R, et al. Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: studies in mice and monkeys. *ACS Nano*. 2013;7(8):7303-10.
8. Ansari AA, Alhoshan M, Alsalhi MS, Aldwayyan AS. Prospects of nanotechnology in clinical immunodiagnosics. *Sensors*. 2010;10(7):6535-81.
9. Janegitz BC, Cancino J, Zucolotto V. Disposable biosensors for clinical diagnosis. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2014;14(1):378-89.
10. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):311-30.
11. Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *Am J Physiol-Renal*. 2005;288(4):F605-F13.
12. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1990;42(12):821-6.
13. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):751-60.
14. Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology*. 2010;188(6):759-68.

15. Li J, Guo C, Feng F, Fan A, Dai Y, Li N, et al. Co-delivery of docetaxel and palmitoyl ascorbate by liposome for enhanced synergistic antitumor efficacy. *Scientific reports*. 2016;6:38787.
16. Lin K-H, Hong S-T, Wang H-T, Lo Y-L, Lin AM-Y, Yang JC-H. Enhancing Anticancer Effect of Gefitinib across the Blood–Brain Barrier Model Using Liposomes Modified with One α -Helical Cell-Penetrating Peptide or Glutathione and Tween 80. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):1998.
17. Jose A, Labala S, Venuganti VVK. Co-delivery of curcumin and STAT3 siRNA using deformable cationic liposomes to treat skin cancer. *Journal of Drug Targeting*. 2016:1-15.
18. Park H, Tsutsumi H, Mihara H. Cell-selective intracellular drug delivery using doxorubicin and α -helical peptides conjugated to gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2014;35(10):3480-7.
19. Li Y, Italiani P, Casals E, Valkenburg D, Mertens I, Baggerman G, et al. Assessing the Immunosafety of Engineered Nanoparticles with a Novel in Vitro Model Based on Human Primary Monocytes. *ACS applied materials & interfaces*. 2016.
20. Kong L, Qiu J, Sun W, Yang J, Shen M, Wang L, et al. Multifunctional PEI-entrapped gold nanoparticles enable efficient delivery of therapeutic siRNA into glioblastoma cells. *Biomaterials Science*. 2017.
21. Hwang JY, Kim ST, Han HS, Kim K, Han JS. Optical Aptamer Probes of Fluorescent Imaging to Rapid Monitoring of Circulating Tumor Cell. *Sensors*. 2016;16(11).
22. Olerile LD, Liu Y, Zhang B, Wang T, Mu S, Zhang J, et al. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2017;150:121-30.
23. Su X, Chan C, Shi J, Tsang MK, Pan Y, Cheng C, et al. A graphene quantum dot@Fe₃O₄@SiO₂ based nanoprobe for drug delivery sensing and dual-modal fluorescence and MRI imaging in cancer cells. *Biosensors & bioelectronics*. 2016.
24. Roberts CM, Shahin SA, Wen W, Finlay JB, Dong J, Wang R, et al. Nanoparticle delivery of siRNA against TWIST to reduce drug resistance and tumor growth in ovarian cancer models. *Nanomedicine*. 2016.
25. Jatzak-Pawlik I, Gorzkiewicz M, Studzian M, Appelhans D, Voit B, Pulaski L, et al. Sugar-Modified Poly (propylene imine) Dendrimers Stimulate the NF- κ B Pathway in a Myeloid Cell Line. *Pharmaceutical Research*. 2017;34(1):136-47.
26. Li KY, Eres G, Howe J, Chuang YJ, Li XF, Gu ZJ, et al. Self-Assembly of Graphene on Carbon Nanotube Surfaces. *Sci Rep-Uk*. 2013;3.
27. Popov VN. Carbon nanotubes: properties and application. *Mat Sci Eng R*. 2004;43(3):61-102.

28. Peng B, Locascio M, Zapol P, Li S, Mielke SL, Schatz GC, et al. Measurements of near-ultimate strength for multiwalled carbon nanotubes and irradiation-induced crosslinking improvements. *Nature nanotechnology*. 2008;3(10):626-31.
29. Collins PG, Avouris P. Nanotubes for electronics. *Scientific American*. 2000;283(6):62-9.
30. Pop E, Mann D, Wang Q, Goodson K, Dai H. Thermal conductance of an individual single-wall carbon nanotube above room temperature. *Nano letters*. 2006;6(1):96-100.
31. Bandaru PR. Electrical properties and applications of carbon nanotube structures. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2007;7(4-5):1239-67.
32. Esquivel E, Murr L. A TEM analysis of nanoparticulates in a polar ice core. *Materials Characterization*. 2004;52(1):15-25.
33. Ponomarchuk V, Semenova D, Moroz T, Titov A, Ryabov V, editors. 250-Ma old nature carbon nanostructuring materials and nanotubes in intrusive rocks. *Mineralogical Magazine: VM Goldschmidt Conference: Extended Abstracts*; 2011.
34. Balasubramanian K, Burghard M. Biosensors based on carbon nanotubes. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(3):452-68.
35. Mascini M, Tombelli S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2008;13(7):637-57.
36. Fabbro C, Ali-Boucetta H, Da Ros T, Kostarelos K, Bianco A, Prato M. Targeting carbon nanotubes against cancer. *Chemical communications*. 2012;48(33):3911-26.
37. Heister E, Neves V, Tilmaciu C, Lipert K, Beltran VS, Coley HM, et al. Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. *Carbon*. 2009;47(9):2152-60.
38. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 2003;22(47):7537-52.
39. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(9):771-82.
40. Shuhendler AJ, Cheung RY, Manias J, Connor A, Rauth AM, Wu XY. A novel doxorubicin-mitomycin C co-encapsulated nanoparticle formulation exhibits anti-cancer synergy in multidrug resistant human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2010;119(2):255-69.
41. Xue X, Liang XJ. Overcoming drug efflux-based multidrug resistance in cancer with nanotechnology. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(2):100-9.

42. Shao W, Paul A, Zhao B, Lee C, Rodes L, Prakash S. Carbon nanotube lipid drug approach for targeted delivery of a chemotherapy drug in a human breast cancer xenograft animal model. *Biomaterials*. 2013;34(38):10109-19.
43. Shao W, Paul A, Rodes L, Prakash S. A New Carbon Nanotube-Based Breast Cancer Drug Delivery System: Preparation and In Vitro Analysis Using Paclitaxel. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;71(3):1405-14.
44. Fu XD, Zhang YY, Wang XJ, Shou JX, Zhang ZZ, Song LJ. Preparation and biological activity of a paclitaxel-single-walled carbon nanotube complex. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(1):1589-603.
45. Gu YJ, Cheng J, Jin J, Cheng SH, Wong WT. Development and evaluation of pH-responsive single-walled carbon nanotube-doxorubicin complexes in cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2889-98.
46. Li R, Wu R, Zhao L, Wu M, Yang L, Zou H. P-glycoprotein antibody functionalized carbon nanotube overcomes the multidrug resistance of human leukemia cells. *ACS Nano*. 2010;4(3):1399-408.
47. Lee PC, Chiou YC, Wong JM, Peng CL, Shieh MJ. Targeting colorectal cancer cells with single-walled carbon nanotubes conjugated to anticancer agent SN-38 and EGFR antibody. *Biomaterials*. 2013;34(34):8756-65.
48. Arlt M, Haase D, Hampel S, Oswald S, Bachmatiuk A, Klingeler R, et al. Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death. *Nanotechnology*. 2010;21(33):335101.
49. Pistone A, Iannazzo D, Ansari S, Milone C, Salamò M, Galvagno S, et al. Tunable doxorubicin release from polymer-gated multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;515(1):30-6.
50. Ghasemvand F, Biazar E, Tavakolifard S, Khaledian M, Rahmanzadeh S, Momenzadeh D, et al. Synthesis and evaluation of multi-wall carbon nanotube–paclitaxel complex as an anti-cancer agent. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*. 2016;9(3):197.
51. Singh RP, Sharma G, Sonali, Singh S, Patne SC, Pandey BL, et al. Effects of transferrin conjugated multi-walled carbon nanotubes in lung cancer delivery. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2016;67:313-25.
52. Yoong SL, Wong BS, Zhou QL, Chin CF, Li J, Venkatesan T, et al. Enhanced cytotoxicity to cancer cells by mitochondria-targeting MWCNTs containing platinum(IV) prodrug of cisplatin. *Biomaterials*. 2014;35(2):748-59.
53. Guo Y, Shi DL, Cho HS, Dong ZY, Kulkarni A, Pauletti GM, et al. In vivo imaging and drug storage by quantum-dot-conjugated carbon nanotubes. *Adv Funct Mater*. 2008;18(17):2489-97.

54. Brennan ME, Coleman JN, Drury A, Lahr B, Kobayashi T, Blau WJ. Nonlinear photoluminescence from van Hove singularities in multiwalled carbon nanotubes. *Optics letters*. 2003;28(4):266-8.
55. Zhang H, Jiao X, Chen Q, Ji Y, Zhang X, Zhu X, et al. A multi-functional nanoplatfor for tumor synergistic phototherapy. *Nanotechnology*. 2016;27(8):085104.
56. Iancu C, Mocan L, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, et al. Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:129-41.
57. Moon HK, Lee SH, Choi HC. In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2009;3(11):3707-13.
58. Wu H, Liu G, Wang X, Zhang J, Chen Y, Shi J, et al. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite nanoparticles loaded on multiwalled carbon nanotubes for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Acta biomaterialia*. 2011;7(9):3496-504.
59. Zhao H, Chao Y, Liu J, Huang J, Pan J, Guo W, et al. Polydopamine Coated Single-Walled Carbon Nanotubes as a Versatile Platform with Radionuclide Labeling for Multimodal Tumor Imaging and Therapy. *Theranostics*. 2016;6(11):1833.
60. Alidori S, Asqiriba K, Londero P, Bergkvist M, Leona M, Scheinberg DA, et al. Deploying RNA and DNA with Functionalized Carbon Nanotubes. *The journal of physical chemistry C, Nanomaterials and interfaces*. 2013;117(11):5982-92.
61. Wu Y, Phillips JA, Liu H, Yang R, Tan W. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. *ACS Nano*. 2008;2(10):2023-8.
62. Kam NW, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *J Am Chem Soc*. 2005;127(36):12492-3.
63. Mohammadi M, Salmasi Z, Hashemi M, Mosaffa F, Abnous K, Ramezani M. Single-walled carbon nanotubes functionalized with aptamer and piperazine-polyethylenimine derivative for targeted siRNA delivery into breast cancer cells. *International journal of pharmaceutics*. 2015;485(1):50-60.
64. Guo C, Al-Jamal WT, Toma FM, Bianco A, Prato M, Al-Jamal KT, et al. Design of cationic multiwalled carbon nanotubes as efficient siRNA vectors for lung cancer xenograft eradication. *Bioconjugate chemistry*. 2015;26(7):1370-9.
65. Raffa V, Ciofani G, Vittorio O, Riggio C, Cuschieri A. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine*. 2010;5(1):89-97.
66. Zhang X, Zhu Y, Li J, Zhu Z, Li J, Li W, et al. Tuning the cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes by surface hydroxylation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(12):6941-52.

67. Wang M, Yu S, Wang C, Kong J. Tracking the endocytic pathway of recombinant protein toxin delivered by multiwalled carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2010;4(11):6483-90.
68. Maruyama K, Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Kobayashi S, et al. Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:793186.
69. Lacerda L, Russier J, Pastorin G, Herrero MA, Venturelli E, Dumortier H, et al. Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*. 2012;33(11):3334-43.
70. Sanz V, Tilmaciu C, Soula B, Flahaut E, Coley HM, Silva SRP, et al. Chloroquine-enhanced gene delivery mediated by carbon nanotubes. *Carbon*. 2011;49(15):5348-58.
71. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*. 2005;9(6):674-9.
72. Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA, Dai HJ. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *P Natl Acad Sci USA*. 2005;102(33):11600-5.
73. Thongkam W, Gerloff K, van Berlo D, Albrecht C, Schins RP. Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. *Mutagenesis*. 2017;32(1):105-15.
74. Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical communications*. 2004(1):16-7.
75. Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of carbon nanotubes. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;620:181-204.
76. Zoroddu MA, Medici S, Ledda A, Nurchi VM, Lachowicz JI, Peana M. Toxicity of nanoparticles. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(33):3837-53.
77. Kotchey GP, Hasan SA, Kapralov AA, Ha SH, Kim K, Shvedova AA, et al. A natural vanishing act: the enzyme-catalyzed degradation of carbon nanomaterials. *Accounts of chemical research*. 2012;45(10):1770-81.
78. Russier J, Menard-Moyon C, Venturelli E, Gravel E, Marcolongo G, Meneghetti M, et al. Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale*. 2011;3(3):893-6.
79. Liu Z, Davis C, Cai WB, He L, Chen XY, Dai HJ. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(5):1410-5.
80. Wang J, Xu Y, Yang Z, Huang R, Chen J, Wang R, et al. Toxicity of carbon nanotubes. *Current drug metabolism*. 2013;14(8):891-9.

81. Franchi LP, Santos RA, Matsubara EY, Lima Jcd, Rosolen JM, Takahashi CS. Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanotubes. *Química Nova*. 2012;35(3):571-80.
82. Patlolla A, Knighten B, Tchounwou P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethnicity & disease*. 2010;20(1 Suppl 1):S1-65-72.
83. Berlo Dv, Clift MJ, Albrecht C, Schins RP. Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13698.
84. Catalán J, Siivola KM, Nymark P, Lindberg H, Suhonen S, Järventaus H, et al. In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*. 2016;10(6):794-806.
85. Sasaki T, Asakura M, Ishioka C, Kasai T, Katagiri T, Fukushima S. In vitro chromosomal aberrations induced by various shapes of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *Journal of Occupational Health*. 2016;58(6):622-31.
86. Jackson P, Kling K, Jensen KA, Clausen PA, Madsen AM, Wallin H, et al. Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta (TM) mouse lung epithelial cell line. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015;56(2):183-203.
87. Mrakovcic M, Meindl C, Leitinger G, Roblegg E, Fröhlich E. Carboxylated short single-walled carbon nanotubes but not plain and multi-walled short carbon nanotubes show in vitro genotoxicity. *Toxicological Sciences*. 2015;144(1):114-27.
88. Louro H, Pinhão M, Santos J, Tavares A, Vital N, Silva MJ. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicology Letters*. 2016;262:123-34.
89. Kim JS, Song KS, Yu IJ. Multiwall Carbon Nanotube-Induced DNA Damage and Cytotoxicity in Male Human Peripheral Blood Lymphocytes. *International journal of toxicology*. 2016;35(1):27-37.
90. Dumortier H. When carbon nanotubes encounter the immune system: desirable and undesirable effects. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(15):2120-6.
91. Sun Z, Liu Z, Meng J, Meng J, Duan J, Xie S, et al. Carbon nanotubes enhance cytotoxicity mediated by human lymphocytes in vitro. *PloS one*. 2011;6(6):e21073.
92. De Nicola M, Nuccitelli S, Gattia DM, Traversa E, Magrini A, Bergamaschi A, et al. Effects of carbon nanotubes on human monocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171:600-5.
93. Qu C, Wang L, He J, Tan J, Liu W, Zhang S, et al. Carbon nanotubes provoke inflammation by inducing the pro-inflammatory genes IL-1 β and IL-6. *Gene*. 2012;493(1):9-12.

94. Meunier E, Coste A, Olagnier D, Authier H, Lefèvre L, Dardenne C, et al. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(6):987-95.
95. Andersen AJ, Robinson JT, Dai H, Hunter AC, Andresen TL, Moghimi SM. Single-walled carbon nanotube surface control of complement recognition and activation. *ACS Nano*. 2013;7(2):1108-19.
96. Pondman KM, Sobik M, Nayak A, Tsolaki AG, Jakel A, Flahaut E, et al. Complement activation by carbon nanotubes and its influence on the phagocytosis and cytokine response by macrophages. *Nanomedicine*. 2014;10(6):1287-99.
97. Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S, Poma A. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutation research*. 2011;722(1):20-31.
98. Jiang Y, Zhang H, Wang Y, Chen M, Ye S, Hou Z, et al. Modulation of apoptotic pathways of macrophages by surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *PloS one*. 2013;8(6):e65756.
99. Elgrabli D, Dachraoui W, Menard-Moyon C, Liu XJ, Begin D, Begin-Colin S, et al. Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano*. 2015;9(10):10113-24.
100. Konduru NV, Tyurina YY, Feng W, Basova LV, Belikova NA, Bayir H, et al. Phosphatidylserine targets single-walled carbon nanotubes to professional phagocytes in vitro and in vivo. *PloS one*. 2009;4(2):e4398.
101. Hassan HA, Smyth L, Wang JT-W, Costa PM, Ratnasothy K, Diebold SS, et al. Dual stimulation of antigen presenting cells using carbon nanotube-based vaccine delivery system for cancer immunotherapy. *Biomaterials*. 2016;104:310-22.
102. Laverny G, Casset A, Purohit A, Schaeffer E, Spiegelhalter C, de Blay F, et al. Immunomodulatory properties of multi-walled carbon nanotubes in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and allergic patients. *Toxicol Lett*. 2013;217(2):91-101.
103. Xing J, Liu Z, Huang Y, Qin T, Bo R, Zheng S, et al. Lentinan-modified carbon nanotubes as an antigen delivery system modulate immune response in vitro and in vivo. *ACS applied materials & interfaces*. 2016;8(30):19276-83.
104. Faria PCBd, Santos LI, Coelho JoP, Ribeiro HBc, Pimenta MAao, Ladeira LO, et al. Oxidized multiwalled carbon nanotubes as antigen delivery system to promote superior CD8+ T cell response and protection against cancer. *Nano letters*. 2014;14(9):5458-70.
105. Guo J, Zhang X, Li Q, Li W. Biodistribution of functionalized multiwall carbon nanotubes in mice. *Nuclear medicine and biology*. 2007;34(5):579-83.

106. Liu Z, Cai W, He L, Nakayama N, Chen K, Sun X, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature nanotechnology*. 2007;2(1):47-52.
107. Albini A, Pagani A, Pulze L, Bruno A, Principi E, Congiu T, et al. Environmental impact of multi-wall carbon nanotubes in a novel model of exposure: systemic distribution, macrophage accumulation, and amyloid deposition. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6133-45.
108. Liang G, Yin L, Zhang J, Liu R, Zhang T, Ye B, et al. Effects of subchronic exposure to multi-walled carbon nanotubes on mice. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2010;73(7):463-70.
109. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207(3):221-31.
110. Alidori S, Bowman RL, Yarilin D, Romin Y, Barlas A, Mulvey JJ, et al. Deconvoluting hepatic processing of carbon nanotubes. *Nature communications*. 2016;7:12343.
111. Hadidi N, Kobarfard F, Nafissi-Varcheh N, Aboofazeli R. PEGylated single-walled carbon nanotubes as nanocarriers for cyclosporin a delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):593-600.

CONSIDERAÇÕES FÍNAIS

Nos estudos apresentados na presente dissertação demonstramos inicialmente a eficiência da polimerização de nanotubos de carbono com polietilenimina para a incorporação da droga antitumoral paclitaxel. O revestimento dos CNT com o anticorpo anti-PSMA mostrou-se eficiente em transportar a droga para as células de câncer prostático LNCaP, cuja a ação tóxica foi superior à droga pura usada como controle. A preparação de CNT-PTX mostrou-se tóxica também para a linhagem de câncer colorretal HCT-116 (PSMA⁻), mas o revestimento com o anticorpo (CNT-PTX-Ab) não promoveu qualquer incremento na atividade tóxica, comprovando a especificidade do anticorpo usado. Além disso, os estudos com monócitos de doadores normais indicaram que, embora interajam ativamente, essas partículas são inócuas às células de defesa.

Após definirmos o método de incorporação do PTX nos nanotubos, decidimos tentar a viabilidade de uso de glicose para induzir interação preferencial das partículas com as células tumorais de próstata. Nossos resultados mostram que o benefício dessa abordagem foi muito discreto, endereçar os CNT para as células de câncer prostático. Ao contrário do esperado, tal tratamento não inibiu a interação das partículas com monócitos e células dendríticas, resultando em efeitos adversos a essas células.