

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 endereça-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 – Analise 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 “endereçoamento” 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 endereçoamento 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 endereçoamento 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 Ovar8	(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 propriedade 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 doxorrubicina. 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 doxorrubicina 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 BCL9l (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 consequente 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 alterada 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, Valkenborg 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 nanoplatfrom 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, Olaghier 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 LId, 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.

CAPÍTULO 2: TRANSPORTE DE PACLITAXEL POR NANOPARTÍCULAS DE CARBONO REVESTIDAS COM ANTICORPO ANTI-PSMA PARA CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO

Resumo

O câncer prostático é o principal tipo de tumor em indivíduos do sexo masculino e a frequência de recidivas e metástases demanda o desenvolvimento de novas propostas diagnósticas e terapêuticas. Neste cenário, o presente estudo objetivou desenvolver nanocarreadores para o transporte de agentes antineoplásicos para as células tumorais. Com esse propósito, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (CNT) foram funcionalizadas com polietilenimina (PEI) para a incorporação de paclitaxel (PTX), droga de primeira linha para o tratamento do câncer prostático. Essas partículas foram então revestidas com anticorpos dirigidos ao antígeno prostático específico de membrana (anti-PSMA), visando o endereçamento dos carreadores para as células tumorais prostáticas. Adicionalmente, as partículas foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína, uma substância fluorescente para permitir a visualização da aderência ou internalização pelas células alvo. As nanopartículas foram então testadas *in vitro* quanto: a) a especificidade para células tumorais PSMA⁺; b) internalização das partículas pelas células tumorais, e c) a atividade citotóxica do paclitaxel imobilizado nos nanocarreadores. Para testar a especificidade os nanocarreadores foram expostos às células LNCaP (tumor prostático humano), células HCT-116 (de câncer colorretal humano: PSMA⁻), linfócitos e monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis. A adesão/internalização foi analisada através de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo e a atividade citotóxica da droga imobilizada foi testada por exposição *in vitro* de células tumorais –alvo aos nanocarreadores. Os nossos resultados demonstraram que as células de câncer prostático foram mais suscetíveis aos nanotubos complexados com quimioterápico do que ao CNT ou PTX puro. A presença de anti-PSMA na superfície das nanopartículas (CNT-PTX-Ab) induziu um maior índice de morte celular do que apenas CNT-PTX. Os CNTs não funcionalizados não foram capazes de interferir no fenótipo de monócitos, porém a incorporação do quimioterápico provocou mudanças no seu fenótipo. Nossos resultados apontam para a viabilidade de uso de anticorpos anti-PSMA para endereçamento de nanopartículas para as células prostáticas, aumentando a efetividade da entrega de drogas antitumorais.

Abstract

Prostate Cancer is the main type of tumor in men and the high frequency of relapsing and metastasis diseases requires the development of new diagnostic and therapeutic approaches. In this scenario, the present study aimed to develop nanocarriers for transporting antineoplastic agents to cancer cells. Multiple wall carbon nanotubes (CNT) were functionalized with polyethylenimine in order to incorporate paclitaxel (PTX), the first line treatment for prostate cancer. These particles were then covered with antibodies for prostate specific membrane antigen (PSMA) aiming to address them to prostate cancer cells. In addition, nanotubes were labeled with fluorescein isothiocyanate to allow visualization of their adherence or internalization by target cells. CNT preparations were tested in vitro on a) specificity for PSMA⁺ tumor cells; b) adherence/internalization by tumor cells, and c) the cytotoxic activity of paclitaxel transported by CNT. In order to test the specificity of CNT covered with anti-PSMA, they were exposed to cancer cell lines LNCaP (prostate PSMA⁺ cells), HCT-116 (colorectal PSMA⁻ cells), and human peripheral blood lymphocytes and monocytes. Adhesion/internalization was analyzed by immunofluorescence microscopy and flow cytometry, while cytotoxic activity of CNT preparations was tested by in vitro challenge of tumor cells. Our results show that prostate cancer cells were more susceptible to CNT complexed with PTX (CNT-PTX) than to pure PTX or CNT alone. Loading of anti-PSMA on nanotubes (CNT-PTX-Ab) induced higher levels of cell death than CNT-PTX. Both CNT-PTX and CNT-PTX-Ab induced phenotypic changes in monocytes but CNT alone did not show this effect. Our results indicate anti-PSMA is useful to address nanoparticles to prostatic cancer, enhancing the effectivity of antineoplastic drug delivery.

Lista de Figuras

Figura 1 - Síntese de CNT com polietilenimina (PEI) por EDC/NHS química para posterior incorporação de anticorpos monoclonais anti-PSMA na superfície dos nanotubos, de modo a agirem como agentes direcionadores às células tumorais, seguida de conjugação com quimioterápico paclitaxel (PTX) nas suas paredes. As células foram expostas aos CNTs em placas de cultura por 48h e depois recolhidas para marcação fenotípica com anticorpos fluorescentes ou verificação de indução de morte celular utilizando o ensaio de Anexina V por citometria de fluxo.....45

Figura 2 - Caracterização dos nanotubos de carbono por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises dos espectros de FTIR das amostras de CNT puro, CNT hidroxilado (CNT-COOH) e CNT conjugado com polímero (CNT-PEI), indicaram os principais componentes das nanopartículas depois de submetidas aos tratamentos com ácido sulfúrico/ácido nítrico e incorporação de polímeros. A incorporação do polímero polyethylenimine (PEI) na nanopartícula (CNT-PEI) é observada pela presença de vibrações moleculares, características, de grupos aminas (regiões 2-5).....52

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de CNT puro (A) e CNT conjugado com PEI (B). Por espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDX) observamos a presença dos elementos químicos que compõem as amostras de CNT puro (C) e CNT-PEI (D). Por essa técnica foi possível averiguar a presença do polímero nos CNT pela presença da banda de nitrogênio (indicada pela seta) nas amostras de CNT-PEI.....54

Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de (A) CNT puro e (B) CNT conjugados com PEI em dois diferentes aumentos.....55

Figura 5 - Espectro de absorbância em diferentes concentrações de (A) CNT e (B) PTX. A partir dos valores de absorbância foram montadas suas respectivas curvas padrões. Comparando os espectros de absorbância do CNT e PTX foi possível estima a concentração da nanopartícula e do quimioterápico incorporado na solução de (C) CNT-PTX.....56

Figura 6 – Incorporação de nanopartículas FITC⁺ nas células de câncer prostático (LNCaP) (cultivadas por 48 h com CNT-FITC) demonstradas por microscopia de fluorescência (aumentada 40x) (A) e analisadas por citometria de fluxo. Baseados nos parâmetros de tamanho e granulosidade (B), as células FITC⁺ (verde) podem ser observadas dentro da população principal de LNCaP. Histogramas demostram a porcentagem de células de câncer prostático (C) marcadas pelas nanopartículas, nos quais o histograma em verde representa as células FITC⁺ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada.....57

Figura 7 - Citotoxicidade dos nanotubos e paclitaxel em células de câncer prostático (LNCaP) avaliado por ensaio de redução do metil tetrazolio (MTT). LNCaP (1×10^4 células por poço) foram expostas a diferentes concentrações de PTX (A), CNT puro (B) e CNT conjugado com PEI (C) para averiguar sua resposta e estimar a dose de trabalho. O efeito do PTX comparado às nanopartículas (1,0 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) foi comparado com a ação do PTX puro (9,9 e 0,99 nM) e de CNT apenas polimerizado (CNT-PEI) (D). A diferença estatística entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).....58

Figura 8 – Viabilidade celular avaliada por marcação com Anexina- V^+ e 7AAD $^+$ (LNCaP) depois de submetidas por 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A) e CNT (conjugado com PEI) (B).....60

Figura 9 - Viabilidade celular avaliada pela marcação com Anexina- V^+ e 7AAD $^+$ (LNCaP) depois de submetidas por 48h a tratamentos com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab nas concentrações de 1, 3 e 5 $\mu\text{g/ml}$. A viabilidade celular, também, foi avaliada nas mesmas concentrações molares de PTX que foram carregada pelas nanopartículas nas respectivas concentrações (16,47; 49,41 e 82,35 nM).....61

Figura 10 – Incorporação de CNT-PTX-FITC e CNT-PTX-Ab-FITC nas células de câncer prostático (verde) baseados nos parâmetros de tamanho e granulosidade e as respectivas viabilidade celular das células FITC $^+$ avaliada por marcação com Anexina- V^+ e 7AAD $^+$ depois de submetidas por 48h aos tratamentos.....62

Figura 11 – Intensidade média de fluorescência (MFI) apresentada pela célula tumoral da próstata (LNCaP) depois de tratadas com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab fluoreceinados com FITC, nas concentrações de 1, 3 e 5 $\mu\text{g/ml}$ 63

Figura 12 - Análise de viabilidade celular por quadrantes Anexina- V^+ e 7AAD $^+$ das células de câncer prostático (LNCaP) depois de submetidas a 96h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A); CNT-PTX (B); CNT-PTX-Ab (C) e PTX (D).....64

Figura 13 - Análise de viabilidade celular por Anexina- V^+ e 7AAD $^+$ de células de adenocarcinoma de cólon (HCT-116 e CACO-2) depois de submetidas a 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento); CNT (conjugado com PEI); CNT-PTX; CNT-PTX-Ab e PTX.....65

Figura 14 - Incorporação de CNT-FITC em monócitos (A) (verde) baseados nos parâmetros de tamanho e granulosidade. Histogramas demonstrando a porcentagem de monócitos (B) marcadas pelas nanopartículas, nos quais o histograma em verde representa as células FITC $^+$ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada. Dupla marcação com FITC e APC (C) demonstrou a incorporação das nanopartículas marcadas com FITC apenas pela população CD14 $^+$ (marcada em APC). Intensidade média de fluorescência (MFI) apresentada pelos monócitos (n=5) (D) depois de tratadas, por 48h, com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab fluoreceinados com FITC.....66

Figura 15 – Citotoxicidade dos CNTs nos monócitos (n=5). Porcentagem de células Anexina-V⁺ (A) e 7AAD⁺ (B) depois de expostas por 48h aos tratamentos com CNT-PTX, CNT-PTX-Ab e PTX. A diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos.....67

Figura 16 - Estratégia de gating nas análises de monócitos: A) gate singlets representando eventos que passaram individualmente pelo laser; B) gate na população de interesse, baseado em tamanho e granulosidade das células; C) gate feito nos eventos 7AAD⁻ para exclusão das células mortas; D) gate feito dentro da população CD14⁺ para os monócito. Observamos a porcentagem de células que expressam HLA-DR (E) e CD83 (F). Os grupos experimentais foram compostos por CNT, CNT-PTX, CNT-PTX-Ab e PTX. A diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos.....68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Moléculas analisadas na superfície de monócitos com seus respectivos marcadores.....51

Tabela 2: Principais componentes das vibrações moleculares detectadas por FTIR nas amostras de CNTs.....53

Tabela 3: Quantificação de carbono, nitrogênio, oxigênio e ouro nas amostras de CNT e CNT-PEI geradas a partir de EDX.....54

Sumário

1. INTRODUÇÃO	41
2. OBJETIVO	44
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4. METODOLOGIA	46
4.1 Oxidação dos nanotubos de carbono	46
4.2 Modificação dos CNT com polietilenimina (PEI)	46
4.3 Marcação do CNT-PEI com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células	46
4.4 Incorporação de CNT por células de câncer prostático e células mononucleares	47
4.5 Incorporação de paclitaxel aos CNT (CNT-PTX)	47
4.6 Imobilização de anticorpo anti-PSMA nos nanotubos de carbono por EDC-NHS química	47
4.7 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	47
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (TEM)	48
4.9 Cultura de células	48
4.10 Ensaio de citotoxicidade (MTT)	48
4.11 Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo	49
4.12 Cultura de monócitos humanos	50
4.13 Fenotipagem de monócitos expostos aos CNT	50
4.14 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Caracterização das nanopartículas por FTIR	52
5.2 Alteração morfológica dos CNT induzida pela incorporação de materiais	53
5.3 Espectroscopia de CNT incorporado com PTX	55
5.4 Interação das nanopartículas com células tumorais	56
5.5 CNT-PTX e CNT-PTX-Ab reduzem a viabilidade das células tumorais LNCaP	57
5.6 CNT-PTX e CNT-PTX-Ab induzem apoptose/necrose de células tumorais LNCaP	59
5.7 A indução de apoptose é dependente da interação com nanopartícula	59
5.8 Aumento da toxicidade pela presença de anticorpo é específica	64
5.9 Mimetização dos CNT-PTX com anticorpo anti-PSMA (CNT-PTX-Ab) reduz a captura das partículas por monócitos humanos	66

5.10 Captura de CNT-PTX e CNT-PTX-Ab por monócitos humanos não afeta sua viabilidade	
-----	67
5.11 A incorporação de anti-PSMA nos CNT-PTX reduz o possível efeito supressor dessas partículas-----	68
6. DISCUSSÃO -----	69
7. CONCLUSÃO -----	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	73

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o quarto câncer de maior incidência em todo o mundo (o segundo mais frequente entre os homens), com 307.000 mortes em 2012 e registros de 1,1 milhões de novos casos (1). No Brasil foram registrados 13.772 mortes em 2013 e uma estimativa de 61.200 novos casos em 2016, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil).

O tratamento usual dos pacientes com câncer de próstata baseia-se na terapia de bloqueio hormonal, cirurgia e radio- ou quimioterapia, sendo dependente do estágio de desenvolvimento da doença (2-4). Sua progressão é relativamente lenta, mas com frequentes casos de metástases e recidivas. A quimioterapia é utilizada nos casos de metástase utilizando-se drogas injetáveis ou administrados por via oral, que atingem a corrente sanguínea e se difundem sistemicamente para atingir as células metastáticas.

A quimioterapia emprega uma ou mais drogas injetáveis ou orais que atingem a corrente sanguínea e se espalham por todo o organismo, destruindo as células cancerosas. Os quimioterápicos atuam primordialmente em células em divisão, de modo que as células tumorais, que apresenta elevado índice de mitose, mostram-se muito suscetíveis às drogas. Porém, outras células do corpo, tais como as da medula óssea, intestino, pele e mucosas também se dividem rapidamente e são suscetíveis ao tratamento, o que pode levar a efeitos colaterais diversos como perda de cabelo, mucosite, perda de apetite, náuseas e vômitos (5). Células do sistema imune também se caracterizam por proliferação intensa frente a um desafio imunogênico, de modo que a quimioterapia também pode determinar quadros de imunossupressão, que tanto pode aumentar a suscetibilidade do paciente à infecções diversas, como também comprometer sua capacidade de combater o tumor.

Entre os quimioterápicos utilizados para tratar câncer de próstata encontram-se os taxóis, como docetaxel, cabazitaxel e paclitaxel, que atuam interferindo nos microtúbulos, que são parte do arranjo celular necessário à divisão celular. Como resultado, o tratamento com paclitaxel (PTX) leva à anormalidade no fuso mitótico e da segregação de cromossomos e, consequentemente, defeitos de divisão celular. Ao estabilizar os microtúbulos e impedir sua desmontagem, o PTX prende o ciclo celular nas fases G_0/G_1 e G_2/M , induzindo a morte celular (6, 7). Como as células cancerosas se dividem mais rapidamente do que as células normais, são mais propensos aos efeitos do medicamento. Porém, o PTX não age somente nas células tumorais e sua aplicação leva a efeitos colaterais como toxicidade cardiovascular, hepatotoxicidade, anafilaxia e mielotoxicidade (8-11), especialmente porque sua administração

geralmente segue o esquema convencional de uso de dose máxima tolerável da droga, com efeitos colaterais que comprometem sobremaneira a qualidade de vida dos pacientes.

As nanopartículas podem ajudar a conduzir os medicamentos às células tumorais, evitando a ação dos quimioterápicos nos tecidos saudáveis, diminuindo os efeitos colaterais no organismo e proporcionando maior ação dos fármacos no sítio tumoral. A utilização de nanotubos de carbono como veículo carreador de quimioterápicos tem sido amplamente investigada pois suas dimensões permitem que sejam complexados com grande quantidade de fármacos e conjugados com moléculas que facilitem sua interação com as células alvo.

Atualmente, há diversas linhas de pesquisas que visam melhorar a internalização dos CNTs pelas células, conjugando-os com marcadores específicos de superfície ou elementos que sejam atrativos às células. Bons resultados, *in vitro*, foram obtidos complexando os CNTs com vitaminas, açúcares, proteínas e peptídeos (12-16), possibilitando a interação da nanopartícula com receptores nas células tumorais e aumentando a toxicidade dos fármacos.

A fim de garantir a ação das nanopartículas nas células tumorais, anticorpos monoclonais e aptâmeros (17) tem sido utilizados como forma de direcionar os CNTs a uma resposta específica. Um dos primeiros resultados de CNTs funcionalizados com anticorpos, demonstrou a alta afinidade e especificidade da nanopartícula às células de câncer de mama decorrente de sua funcionalização com Anti-HER2 (18). Em células de câncer colorretal, nanotubos conjugados com anti-EGFR e quimioterápicos demonstraram ser endocitados principalmente via EGFR, gerando maior efeito citotóxico nas células com maior expressão do marcador (19). Quando complexados com paclitaxel e anticorpos que favoreçam sua interação com células de câncer de mama, os CNTs são capazes de produzir maior toxicidade que o tratamento com o próprio quimioterápico *in vitro* (20) e *in vivo* (21). Experimentos *in vivo* com MWCNT carregando doxorubicina e complexado com anticorpo monoclonal anti-PSCA, demonstraram que as nanopartículas são capazes de impedir a proliferação de células de câncer prostático no sítio tumoral (22). A presença do anticorpo permitiu a captura das nanopartículas pelas células PSCA⁺, direcionando a ação do quimioterápico às células tumorais e amenizando os efeitos colaterais do fármaco no organismo (22).

Um dos grupos clínicos do câncer prostático é constituído por pacientes prostatectomizados com “recidiva bioquímica”, isto é, nos quais observa-se a elevação dos níveis séricos da proteína prostática específica (PSA) mesmo após remoção cirúrgica da glândula prostática (23). Nesses casos, deduz-se a ocorrência de células metastáticas no organismo, mas em sítio desconhecido, uma vez que os métodos usuais de investigação nem sempre permitem a identificação do local em que tais células se instalaram.

Desse modo, consideramos que o desenvolvimento de uma nanopartícula que fosse endereçada às micrometástases transportando agentes antineoplásicos seria muito útil para o tratamento desse grupo de pacientes, sem a necessidade de exposição a um tratamento quimioterápico convencional baseado na dose máxima tolerável. Consideramos que tal endereçamento possa ser feito revestindo-se os nanocarreadores com anticorpos específicos para antígenos das células prostáticas. O marcador clássico dessas células é o PSA (prostate specific antigen) (24), produzido pela glândula prostática e detectável em baixos níveis no soro de indivíduos saudáveis, mas que encontra-se elevado nos pacientes com câncer ou com hiperplasia prostática (24). Embora seja utilizado como marcador para diagnóstico da recidiva bioquímica, esse talvez não seja um bom alvo para endereçamento dos nanocarreadores, visto que as proteínas presentes no soro poderiam interagir com os carreadores revestidos com anti-PSA, reduzindo a disponibilidade de partículas que pudessem interagir com as células alvo espalhadas pelo corpo.

Outra proteína-alvo utilizável como marcador das células prostáticas é o PSMA (antígeno específico de membrana da próstata), presente em uma porcentagem grande de células prostáticas e capaz de aumentar a seletividade das nanopartículas para as células tumorais (25, 26). Essa proteína localiza-se na membrana de células prostáticas, estando presente em maior quantidade nos tecidos cancerosos (27-29), sendo detectado também em metástases cerebrais de câncer de mama (30). Devido ao seu alto índice de expressão em estágios avançados da doença e nos casos de recidiva, desempenha um ótimo papel marcador tumoral (31-33).

Com base no exposto, o presente estudo foi formulado para testar a hipótese de que nanotubos de carbono revestidos com anticorpo anti-PSMA, poderão ser usados como nanocarreadores de paclitaxel de modo específicos para células de câncer prostático. Desse modo, paclitaxel foi conjugado a CNT de paredes múltiplas, as quais foram posteriormente revestidos com anticorpos anti-PSMA. Nossos dados mostram que a exposição de células tumorais de próstata a essas nanopartículas provocam maior porcentagem de morte celular que o controle

2. OBJETIVO

O presente estudo teve a finalidade de avaliar a eficiência de nanotubos de carbono revestidos com anticorpo anti-PSMA, em transportar a droga antitumoral paclitaxel para as células de câncer prostático humano e promover a morte celular. Assim, este trabalho visou:

- a) Sintetizar nanotubos de carbono de paredes múltiplas com paclitaxel e revesti-los com anticorpo anti-PSMA;
- b) Verificar a especificidade dos nanocarreadores para células prostáticas;
- c) Verificar a internalização dos nanocarreadores e seus efeitos nas células tumorais;
- d) Avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono em células imunocompetentes.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

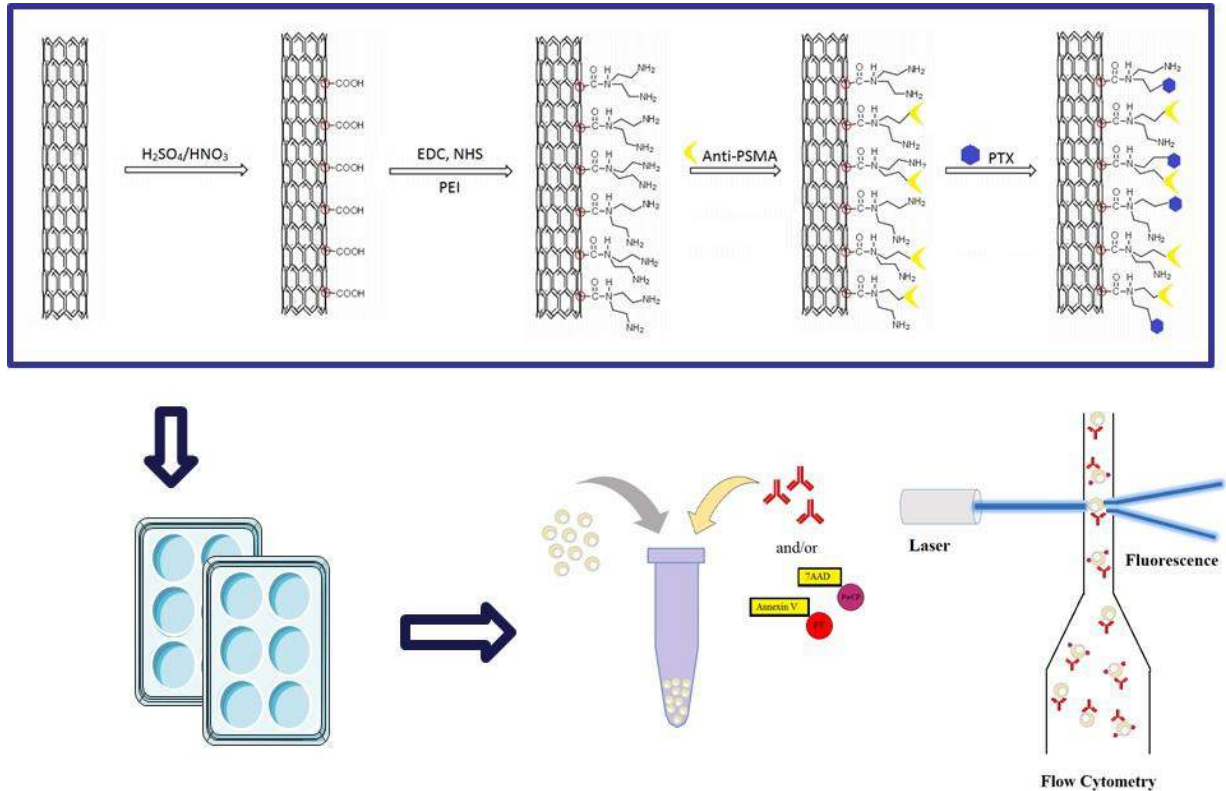


Figura 1 - Síntese de CNT com polietilenimina (PEI) por EDC/NHS química para posterior incorporação de anticorpos monoclonais anti-PSMA na superfície dos nanotubos, de modo a agirem como agentes direcionadores às células tumorais, seguida de conjugação com quimioterápico paclitaxel (PTX) nas suas paredes. As células foram expostas aos CNTs em placas de cultura por 48h e depois recolhidas para marcação fenotípica com anticorpos fluorescentes ou verificação de indução de morte celular utilizando o ensaio de Anexina V por citometria de fluxo.

4. METODOLOGIA

4.1 Oxidação dos nanotubos de carbono.

Para preparar a suspensão aquosa de nanotubos, cinco miligramas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (CNT), com dimensões de 6-9 nm de diâmetro e 5 µm de comprimento, foram sonificadas num sonicador Branson (modelo 1510), durante 24 horas em uma mistura de H₂SO₄ e 70% de HNO₃, na proporção de 3:1 (34). A suspensão foi esfriada e mantida em repouso por 4h para permitir a precipitação dos nanotubos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado extensivamente com água deionizada por centrifugação até que o pH da solução se tornasse neutro (pH 7,0). O precipitado foi, em seguida, liofilizado para posterior uso dos nanotubos de carbono oxidados para a imobilização do paclitaxel (PTX) e do anticorpo anti-PSMA.

4.2 Modificação dos CNT com polietilenimina (PEI).

Para aumentar sua polidispersividade em soluções aquosas e permitir a incorporação de quimioterápicos, fluorocromos e de anticorpos, os CNT foram sintetizados com polietilenimina (PEI). A fim de ativar as hidroxilas dos CNT, cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 0,6 g) e N-hidroxissuccinimida (NHS, 0,6 g) foram acrescentados a uma suspensão de nanotubos (10 mg) em metanol (50 mL). A mistura foi agitada suavemente à temperatura ambiente durante 3 h, em seguida, PEI (0,6 g) foi adicionado à solução de CNT ativada, seguido por mais 24 h de agitação (22).

Os CNT incorporados com o polímero foram separados por centrifugação, sendo lavados com água deionizada várias vezes para remover o excesso de polímero, e seguindo-se de secagem à vácuo.

4.3 Marcação do CNT-PEI com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células.

Para marcação fluorescente os CNT (0,2 mg) foram dispersos em 1 mL de PBS adicionando-se, em seguida, 1 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC). A mistura foi agitada no escuro à temperatura ambiente durante 24h (2). CNT-FITC foram recuperados por centrifugação e lavados com PBS diversas vezes e a suspensão final foi preparada com PBS.

Esses nanotubos fluoro marcados foram apenas para verificar a incorporação dos CNT por células mononucleares (monócitos) e células de câncer prostático (LNCaP).

4.4 Incorporação de CNT por células de câncer prostático e células mononucleares.

As células foram expostas a uma solução de 1 µg/ml de CNT-FITC durante 48h. Os monócitos foram identificados com anticorpos anti-CD14 marcados com APC para verificar sua incorporação. Os resultados adquiridos em citômetro de fluxo modelo FACS Canto II foram analisados utilizando o software FlowJo, versão vX. 10.6.

4.5 Incorporação de paclitaxel aos CNT (CNT-PTX).

A incorporação de paclitaxel (PTX) aos CNT (CNT-PTX) foi preparada misturando 3 ml da suspensão de CNT a 0,1 mg/ml com 100 µl de PTX a 1 mg/ml (1,17 mM) dissolvida em PBS e submetida a agitação por 14h à temperatura ambiente (35). A solução foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 min e lavada com água deionizada várias vezes. Após a remoção do PTX não conjugado, o complexo CNT-PTX foi ressuspenso em 1 ml de PBS sob sonicação suave por 30 min. a 40 kHz.

Para estimar a quantidade de PTX conjugado com CNT foi realizada espectroscopia UV/visível das amostras de CNT e PTX em um espectrofotômetro (Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000).

4.6 Imobilização de anticorpo anti-PSMA nos nanotubos de carbono por EDC-NHS química.

Nanotubos de carbono oxidados (1 mg) foram suspensos em 1 mL de água deionizada por sonicação à temperatura ambiente. Em seguida, sob agitação rápida, 24 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 6 mg de N-Hidroxissuccinimida (NHS), foram adicionados à suspensão sendo a mistura agitada continuamente a 4°C durante 3 h (18, 36). Quarenta microlitros de anticorpo anti-PSMA a 0,5 mg/ml foram adicionados à solução, seguido de 12 h de agitação à temperatura de 4°C. A suspensão foi lavadas cuidadosamente com PBS várias vezes, a 10000 rpm, para remover o excesso de EDC, NHS e anticorpos não imobilizado. Os nanotubos conjugados com anticorpo, com PTX (CNT-PTX-Ab), foram finalmente, suspensos em 1 ml de PBS, pH 7,4.

4.7 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

FTIR foi uma das técnicas utilizada na caracterização dos materiais, permitindo a identificação de grupamentos funcionais na superfície. Esta técnica fundamenta-se nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região do IR médio e número de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹. Especificamente para nanotubos de carbono, as bandas

relacionadas aos grupos que contenham carbono, oxigênio e hidrogênio destacam-se na análise do espectro deste material, podendo-se verificar a efetividade de tratamentos químicos, como por exemplo, a funcionalização das paredes dos nanotubos. A análise foi realizada em um equipamento modelo Nicoletspectrometer, Nexus 670, disponibilizado por um de nossos colaboradores.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (TEM).

A morfologia dos nanotubos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), para análise visual da densidade e dimensões externas. A presença de materiais adsorvidos ou incorporados aos nanotubos, foi investigado por espectroscopia de energia dispersiva de Raio-X (EDX). Para análise por MEV, as amostras foram depositadas sobre filmes de óxido de índio dopado com estanho (ITO), metalizados com ouro e observadas no Microscópio Eletrônico Quanta 200 (FEI Company).

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi usada para o estudo da estrutura interna dos CNTs. Para efetuar a análise das nanopartículas, as suspensões de CNT foram depositadas por “drop coating” em grades de cobre e observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit (FEI Company).

4.9 Cultura de células.

As células das linhagens de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e do adenocarcinoma de cólon (HCT-116) foram expandidas e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, 25 mM HEPES, 200 μ M L-glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico (meio completo), para posterior uso experimental. As células foram desgrudadas da superfície das garrafas com uso de tripsina 0,05 % e lavadas em meio completo, seguindo-se o preparo de uma suspensão 1×10^5 cel/ml. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram distribuídas em placas de cultura de poliestireno de 12 poços e incubadas por 48h a 37°C sob tensão de 5% de CO₂. Para análise morfológica da interação dos nanocarreadores sobre as células-alvo, as suspensões celulares foram depositadas sobre uma lamínula redonda de microscopia, estéril e previamente tratada com poli-L-lisina.

4.10 Ensaio de citotoxicidade (MTT).

Como primeira análise de interação das nanopartículas com células, avaliamos seu efeito sobre a viabilidade de células tumorais (LNCaP) utilizando o ensaio colorimétrico do

MTT. Este sal é reduzido a cristais de formazan através do metabolismo mitocondrial, refletindo a atividade de células vivas, sendo utilizado como indicador da viabilidade das células cultivadas. O tratamento foi realizado por adição das partículas e quimioterápicos à cultura de células (1×10^4 células por poço) numa placa de 96 poços de fundo chato por 48h. Como contrastes, foram testados: a) CNT puro; b) CNT conjugado com PEI; c) CNT carregado com PTX (CNT-PTX); e d) apenas PTX. Como controle positivo do ensaio (lise máxima) as células foram incubadas com DMSO. As células vivas aderidas à placa foram incubadas com uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), por 2h à 37°C sob tensão de 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados no interior das células em atividade foram solubilizados com duodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, para posterior leitura em espectrofotômetro à 540 nm.

4.11 Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo.

A atividade citotóxica foi confirmada por citometria de fluxo, utilizando-se a concentração de 1 µg de CNT (todos os nanotubos foram conjugado com PEI) e 10 nM de PTX para cada 1×10^5 células. Para isso células tumorais foram cultivadas em placas de 12 poços e submetidas aos diferentes tratamentos.

Após 48h de incubação, o conteúdo dos poços (partículas em suspensão, bem como restos celulares) foi removido por lavagem delicada dos alvéolos com meio de cultura à 37°C. Cerca de 1×10^5 células foram recolhidas em eppendorfs e centrifugadas a 10000 rpm por 30 seg. e ressuspensas em isoton (PBS, contendo 0,5 % de BSA) e incubadas por 20 min. a temperatura ambiente com Anexina V. Decorrido o tempo de incubação, as células foram recolhidas em tubos de citometria e marcadas com 7-Amino Actinomicina D (7AAD) para sua aquisição no citômetro de fluxo.

A anexina V é um composto marcado com ficoeritrina (PE) que tem afinidade com fosfolipídios da face interna da membrana celular. Células em apoptose modificam a conformação de sua membrana, expondo esses fosfolipídios na face externa, permitindo a ligação com anexina. Assim a identificação dessa marcação nos serve para quantificar células em apoptose. Associamos a esse ensaio o 7AAD, produto marcado com PerCP, cuja intensidade de fluorescência é identificada em outro comprimento de onda. Esse produto penetra em células que sofrem lise osmótica através dos poros formados na superfície, sendo que células 7AAD⁺ representam células que sofreram necrose. Desse modo, a combinação de anexina V com 7AAD seguindo de leitura em citômetro de fluxo nos permite a quantificação de células em apoptose (anexina V⁺) e células mortas (7AAD⁺/anexina V⁺ e 7AAD⁺/anexina V⁻).

Os grupos de trabalho para esse experimento foram: a) CNT (conjugado com PEI); b) CNT carregado com PTX (CNT-PTX); c) CNT conjugado com anticorpo (CNT-Ab); d) CNT conjugado com anticorpo, e paclitaxel (CNT-PTX-Ab) e e) apenas PTX em concentração equivalente.

4.12 Cultura de monócitos humanos.

Sangue periférico de doadores saudáveis (n=5) foi colhido em presença de heparina (anticoagulante) e as células mononucleares foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Isopaque, por centrifugação a 1600 rpm por 35 min. A suspensão celular obtida foi então centrifugada em gradiente de Percoll 51%, e as células do anel formado (rico em monócitos) foram distribuídas em lamínulas redondas estéreis, pré-tratadas com poli-L-lisina. Essas amostras foram avaliadas quanto à capacidade de interação com as diferentes preparações de CNT. As células presentes no precipitado do gradiente de percoll, rico em linfócitos, foram também lavadas e analisadas quanto à capacidade de interiorizar os CNT.

4.13 Fenotipagem de monócitos expostos aos CNT.

A expressão de moléculas na superfície das células expostas às preparações de CNT foram analisadas por citometria de fluxo. Cerca de 1×10^5 monócitos foram recolhidos em eppendorfs e centrifugadas a 10000 rpm por 30 seg. e ressuspensas em isoton. Anticorpos específicos para marcadores de interesse foram adicionados em concentrações apropriadas e incubados por 20 min. a 4°C, ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com isoton e recolhidas em tubos de citometria para sua aquisição no citômetro de fluxo.

As moléculas analisadas foram: CD14 utilizada como marcador da população de monócitos; CD80 (molécula de co-estimulação); HLA-DR (molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe II); CD83; PD-L1 (molécula de supressão); e 7AAD. Os fluorocromos utilizados em cada anticorpo estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1: Moléculas analisadas na superfície de monócitos com seus respectivos marcadores.

Monócitos	Marcador
HLADR	PE
CD80	APC-H7
CD83	PeCy7
PD-L1	PE
CD14	APC
7AAD	PercP

PE = ficoeritrina; PeCy7 = ficoeritrina cyanine tandem 7; APC = alofococianina; APC-H7 = alofococianina cyanine tandem 7; PercP = clorofila peridinina.

4.14 Análise estatística.

Os ensaios que envolveram células de sangue periférico foram realizados com material biológico de 5 doadores saudáveis. Os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey-Kramer, considerando significativas as diferenças com probabilidade de erro menor ou igual a 5% ($\alpha \leq 0,05$). Todos os ensaios funcionais foram repetidos pelo menos 3 vezes.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das nanopartículas por FTIR.

FTIR é uma técnica fundamentada nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região do infravermelho médio e número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} . Especificamente para nanotubos de carbono, as bandas relacionadas aos grupos que contenham carbono, oxigênio e hidrogênio destacam-se na análise do espectro deste material, podendo-se verificar a efetividade de tratamentos químicos, como por exemplo, a funcionalização de suas paredes (Figura 2).

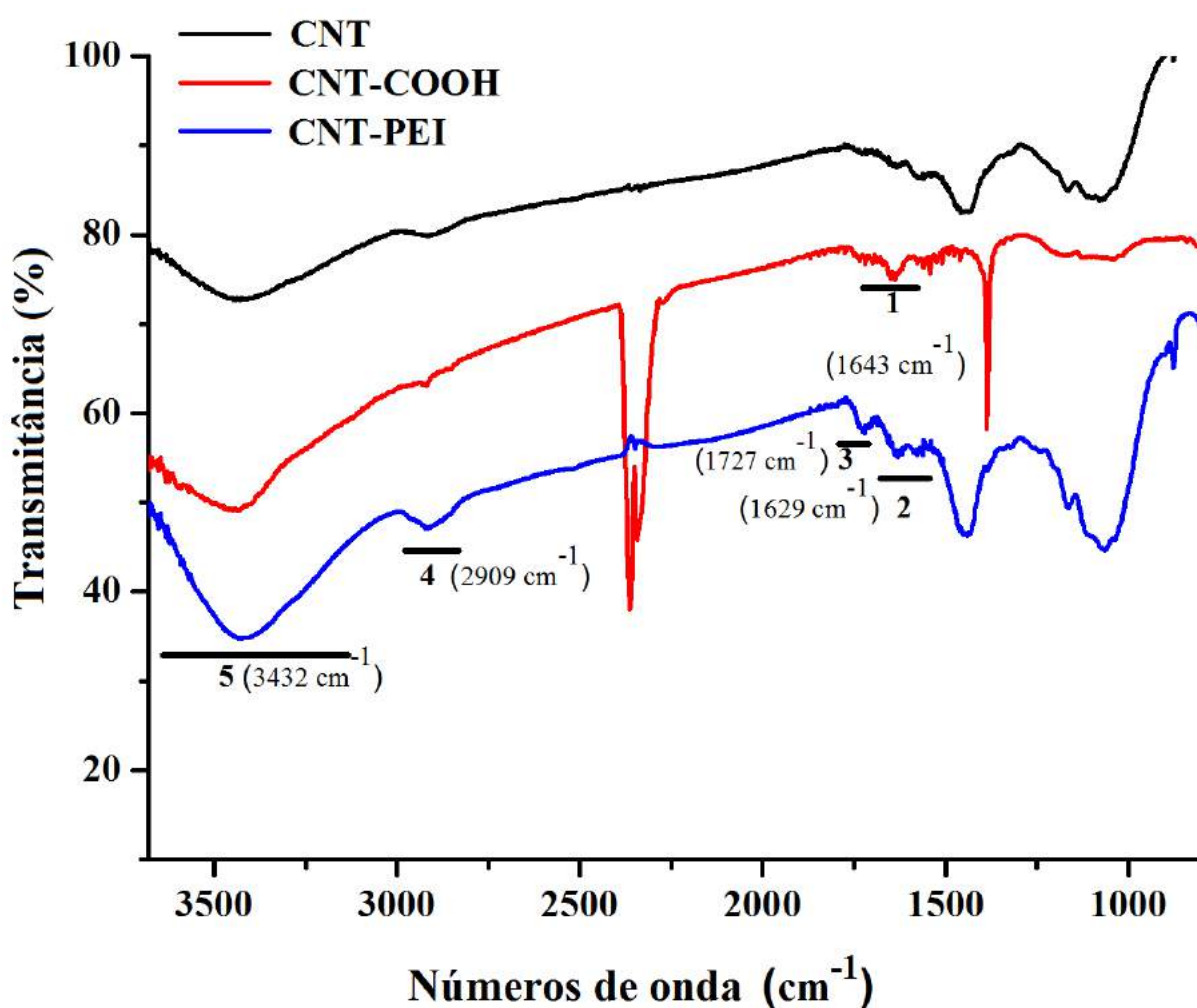


Figura 2 - Caracterização dos nanotubos de carbono por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises dos espectros de FTIR das amostras de CNT puro, CNT hidroxilado (CNT-COOH) e CNT conjugado com polímero (CNT-PEI), indicaram os principais componentes das nanopartículas depois de submetidas aos tratamentos com ácido sulfúrico/ácido nítrico e incorporação de polímeros. A incorporação do polímero polyethylenimine (PEI) na nanopartícula (CNT-PEI) é observada pela presença de vibrações moleculares, características, de grupos aminas (regiões 2-5).

Como detalhado na tabela 2, as regiões correspondentes aos picos 1 e 3 representam estiramentos C=O existentes nas nanopartículas. Como consequência da incorporação do polímero, as vibrações moleculares da região 1 passaram a ser representadas na região 3. A presença de deformação angular N-H e ligações CH₂-NH₂ (também presentes na região do pico 4) no espectro de CNT-PEI contribui para comprovar a incorporação do polímero nas nanopartículas. A região do pico 5 corresponde a estiramentos O-H das nanopartículas e sua maior intensidade no espectro de CNT-PEI pode ser correspondente à presença de ligações N-H e de aminas secundárias.

Tabela 2: Principais componentes das vibrações moleculares detectadas por FTIR nas amostras de CNTs.

REGIÕES	COMPONENTES
1	Estiramento C=O (1643 cm ⁻¹) (37-39).
2	Aminas primárias (CH ₂ – NH ₂), Deformação angular NH (1629 cm ⁻¹) (22, 37).
3	Estiramento C=O (1727 cm ⁻¹) (37-39).
4	C-H; CH ₂ - NH ₂ (40, 41).
5	Estiramento O-H; Estiramento N-H; Aminas Secundárias (CH ₂ - NH - CH ₂) e NH ₂ (40).

5.2 Alteração morfológica dos CNT induzida pela incorporação de materiais.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram utilizado para análise da morfologia dos CNTs após a incorporação dos diferentes materiais. A presença de PEI nos CNT foi evidenciada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) presente no MEV. Por microscopia de varredura observamos as amostras de CNT puro (Figura 3A) e CNT-PEI (Figura 3B) e evidenciamos a presença do polímero nas amostras pela detecção de átomos de nitrogênio nos respectivos espectros de EDX (Figuras 3C e 3D). A tabela 3 demonstra a porcentagem de nitrogênio presente nas amostras de CNTs entre os átomos de carbono, oxigênio e ouro.

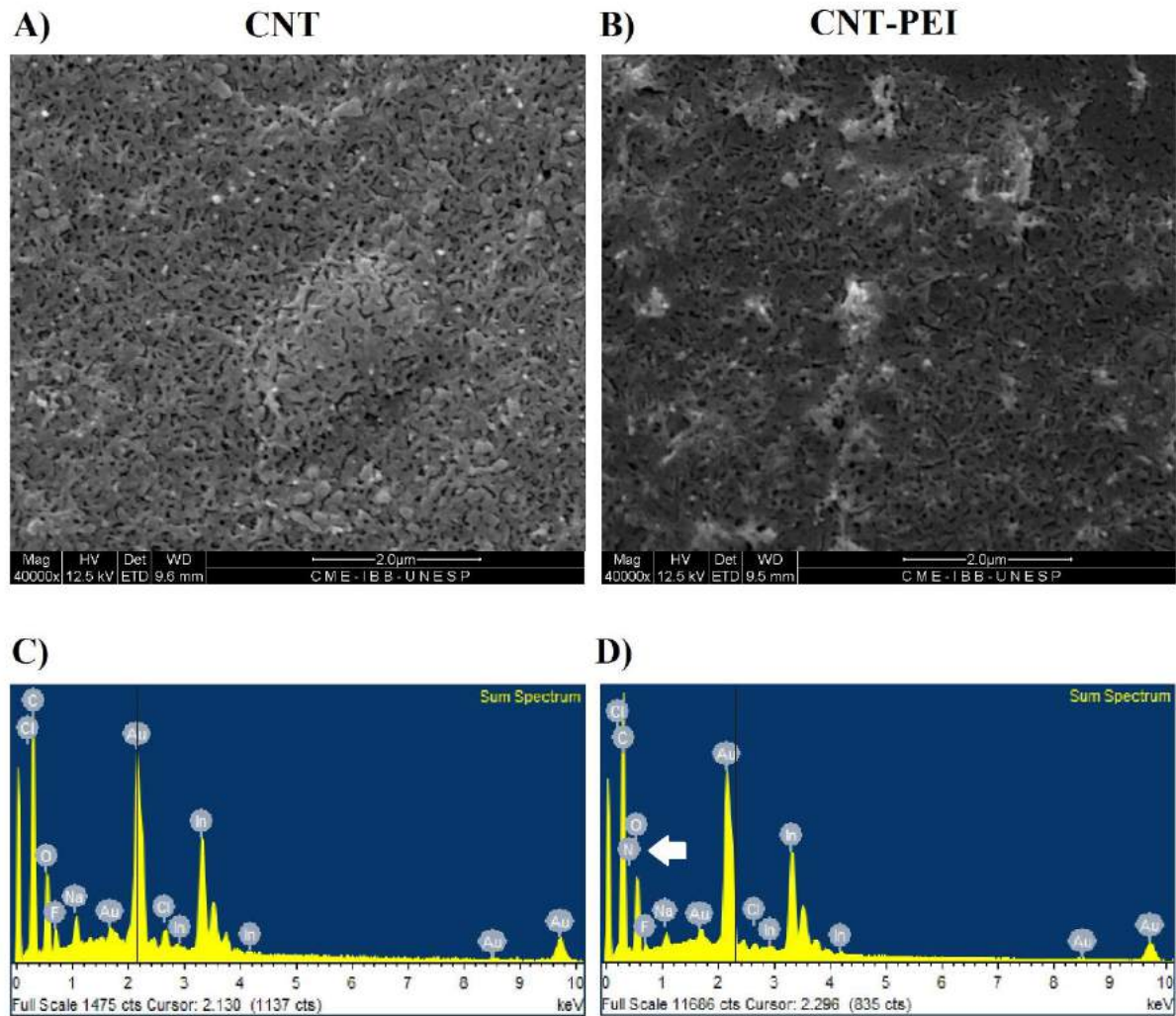


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de CNT puro (A) e CNT conjugado com PEI (B). Por espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDX) observamos a presença dos elementos químicos que compõem as amostras de CNT puro (C) e CNT-PEI (D). Por essa técnica foi possível averiguar a presença do polímero nos CNT pela presença da banda de nitrogênio (indicada pela seta) nas amostras de CNT-PEI.

Tabela 3: Quantificação de carbono, nitrogênio, oxigênio e ouro nas amostras de CNT e CNT-PEI geradas a partir de EDX.

Elementos	CNT		CNT-PEI	
	% Massa	% Atômica	% Massa	% Atômica
C K	44,78	67,37	42,87	65,72
N K	--	--	7,2	5,41
O K	25,63	26,72	23,4	25,2
Au M	29,59	5,90	26,47	3,67
Total	100.00		100.00	

Na Figura 4 demostramos o perfil dos CNTs por TEM e as modificações de suas paredes depois da síntese com polímero. A sequência da Figura 4A demonstra CNT puros em 2

diferentes aumentos. A sequência 4B mostra os CNT após incorporação do PEI, sugerindo aumento da densidade das partículas.

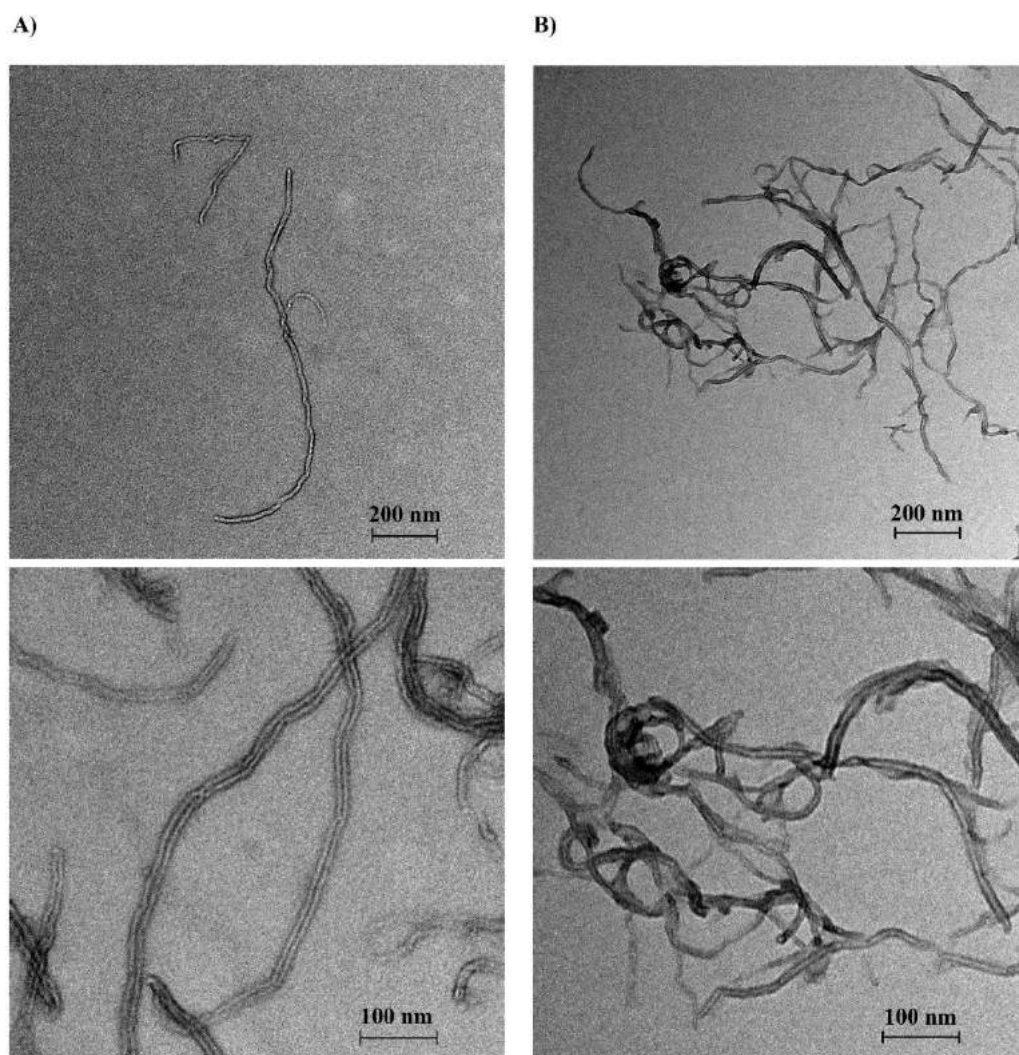


Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de (A) CNT puro e (B) CNT conjugados com PEI em dois diferentes aumentos.

5.3 Espectroscopia de CNT incorporado com PTX.

A incorporação do quimioterápico nas nanopartículas foi evidenciada pela mudança no perfil do espectro de absorção apresentada pelos CNT-PTX (Figura 5C). Estimamos a concentração de PTX incorporado aos CNT intercalando os valores de absorbância do espectro CNT-PTX com os coeficientes angulares de suas respectivas curvas padrão pela lei de Beer-Lambert num sistema 2x2 (35, 42), que resultou na concentração de 2,397 μM de PTX incorporados em 241,7 $\mu\text{g/ml}$ de CNT. Essa incorporação corresponde à 6,34% de quimioterápico, tendo como parâmetro inicial a concentração de PTX adicionado a suspensão de CNT.

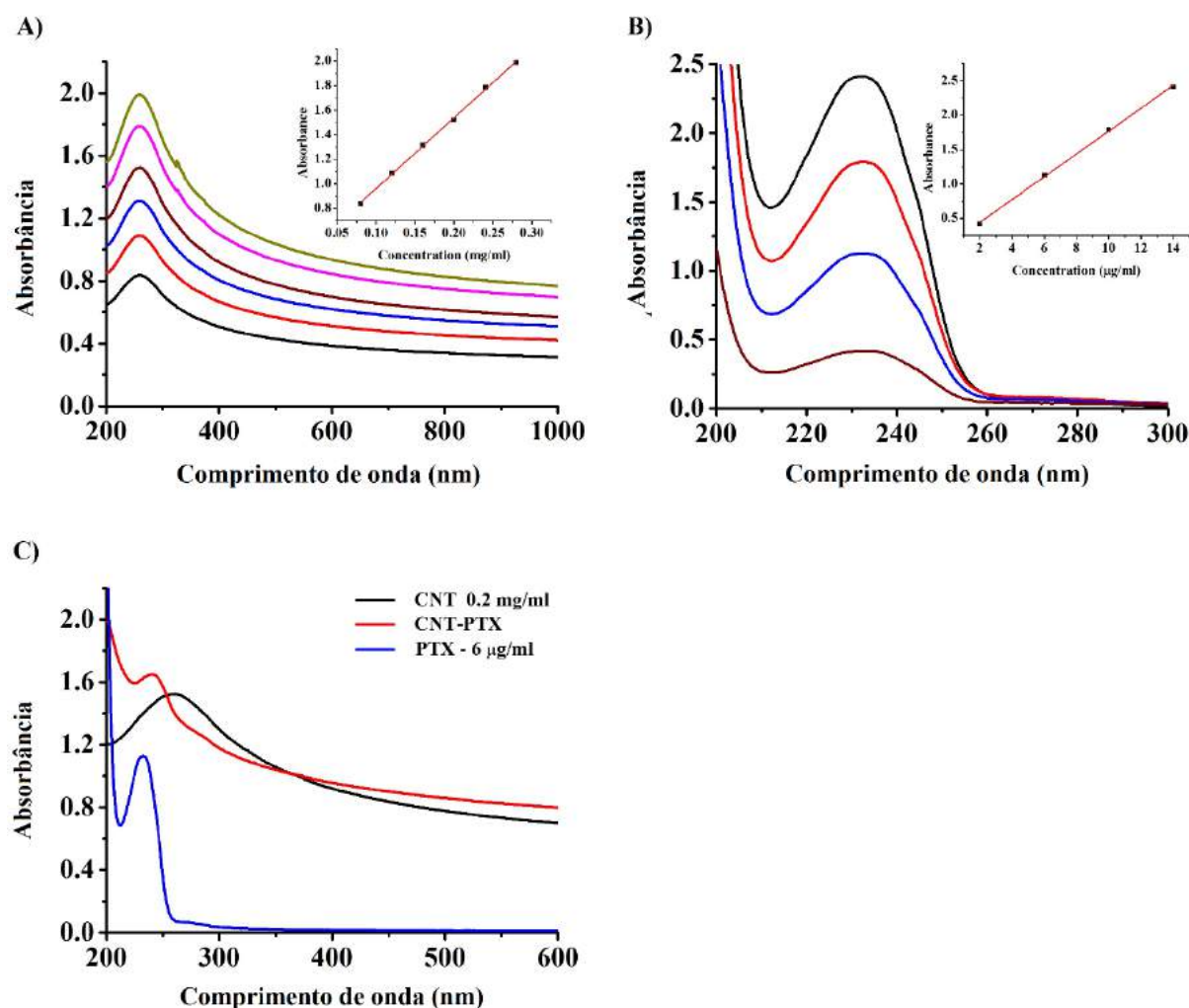


Figura 5 - Espectro de absorvância em diferentes concentrações de (A) CNT e (B) PTX. A partir dos valores de absorvância foram montadas suas respectivas curvas padrões. Comparando os espectros de absorvância do CNT e PTX foi possível estima a concentração da nanopartícula e do quimioterápico incorporado na solução de (C) CNT-PTX.

5.4 Interação das nanopartículas com células tumorais.

Para investigar a interação dos CNT com células de câncer prostático e células imunocompetentes, adicionamos nanotubos previamente marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esse fluorocromo emite luz verde quando excitado por U.V. em laser no comprimento de onda de 488 nm, podendo ser detectado por citometria de fluxo. Este ensaio foi realizado apenas com CNT-PEI marcado com FITC pois foi delineado apenas para evidenciar a interação das nanopartículas com as células.

Imagens de microscopia optica comum demostram que as nanopartículas foram capazes de interagir com as células de câncer prostático (LNCaP), enquanto a microscopia de fluorescência revelou regiões com grande intensidade de fluorescência (Figura 6A) podendo

ser decorrente do acúmulo de CNT-FITC na superfície celular. A análise por citometria de fluxo comprova a interação das nanopartículas com LNCaP (Figuras 6B e 6C), com aproximadamente 63,4% da população de células tumorais exibindo a marcação com FITC.

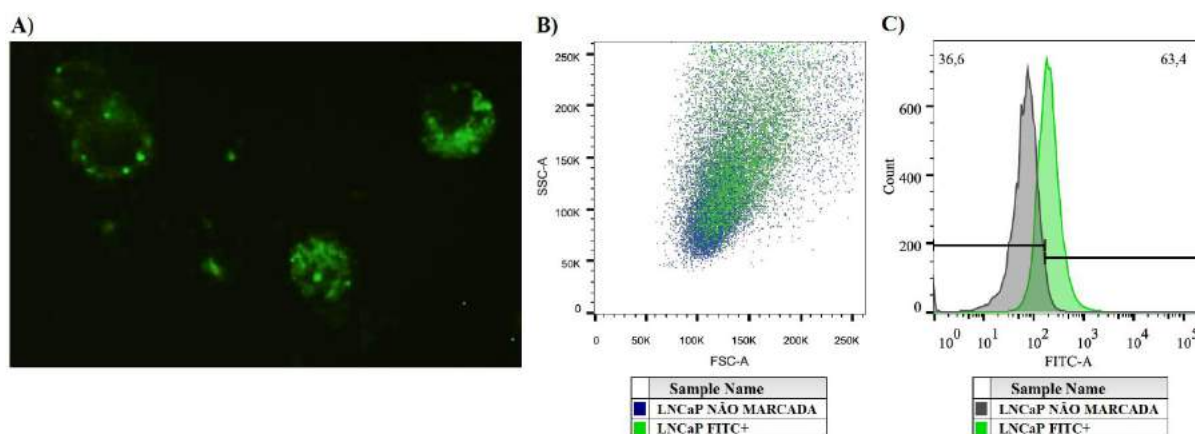


Figura 6 – Incorporação de nanopartículas FITC⁺ nas células de câncer prostático (LNCaP) (cultivadas por 48 h com CNT-FITC) demonstradas por microscopia de fluorescência (aumentada 40x) (A) e analisadas por citometria de fluxo. Baseados nos parâmetros de tamanho e granulidade (B), as células FITC⁺ (verde) podem ser observadas dentro da população principal de LNCaP. Histogramas demonstram a porcentagem de células de câncer prostático (C) marcadas pelas nanopartículas, nos quais o histograma em verde representa as células FITC⁺ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada.

5.5 CNT-PTX e CNT-PTX-Ab reduzem a viabilidade das células tumorais LNCaP.

A Figura 7A ilustra os resultados dos ensaios para determinação das concentrações tóxicas de PTX e CNT. Os dados mostram que as concentrações de 0,08 a 10 μ M de PTX reduziram em cerca de 30% a capacidade de replicação das células tumorais enquanto a concentração de 50 μ M praticamente eliminou todas as células tumorais da cultura.

A adição de CNT puro à cultura mostrou toxicidade a partir de 0,0625 μ g/ml, com ligeira variação até 2 μ g/ml (Figura 7B), observando-se que a incorporação de PEI, reduziu ligeiramente a toxicidade dos nanotubos, como representado na Figura 7C. Assim esses ensaios nos serviram de parâmetro para estabelecer a concentração de trabalho dos nanotubos em 1 μ g/ml.

Como não tínhamos uma referência em relação ao rendimento de incorporação de PTX aos nanotubos, tentamos inicialmente trabalhar com as proporções de 10nM:1 μ g e 1 nM:0,1 μ g de PTX e CNT, respectivamente, estimando que até 10% das moléculas de PTX pudessem ser incorporadas aos CNT. Como descrito no item 3.3, o rendimento final de PTX incorporado aos nanotubos foi de 6,34%.

Assim os dados representados na Figura 7D indicam que a exposição das células ao CNT-PTX (tanto 1 $\mu\text{g/ml}$ quanto 0,1 $\mu\text{g/ml}$) promove redução da viabilidade de modo similar ao PTX puro, em sua maior concentração (9,9 nM). Em contraste, o nanotubo apenas funcionalizado com PEI (CNT-PEI) se mostrou inócuo às células tumorais nas duas concentrações testadas.

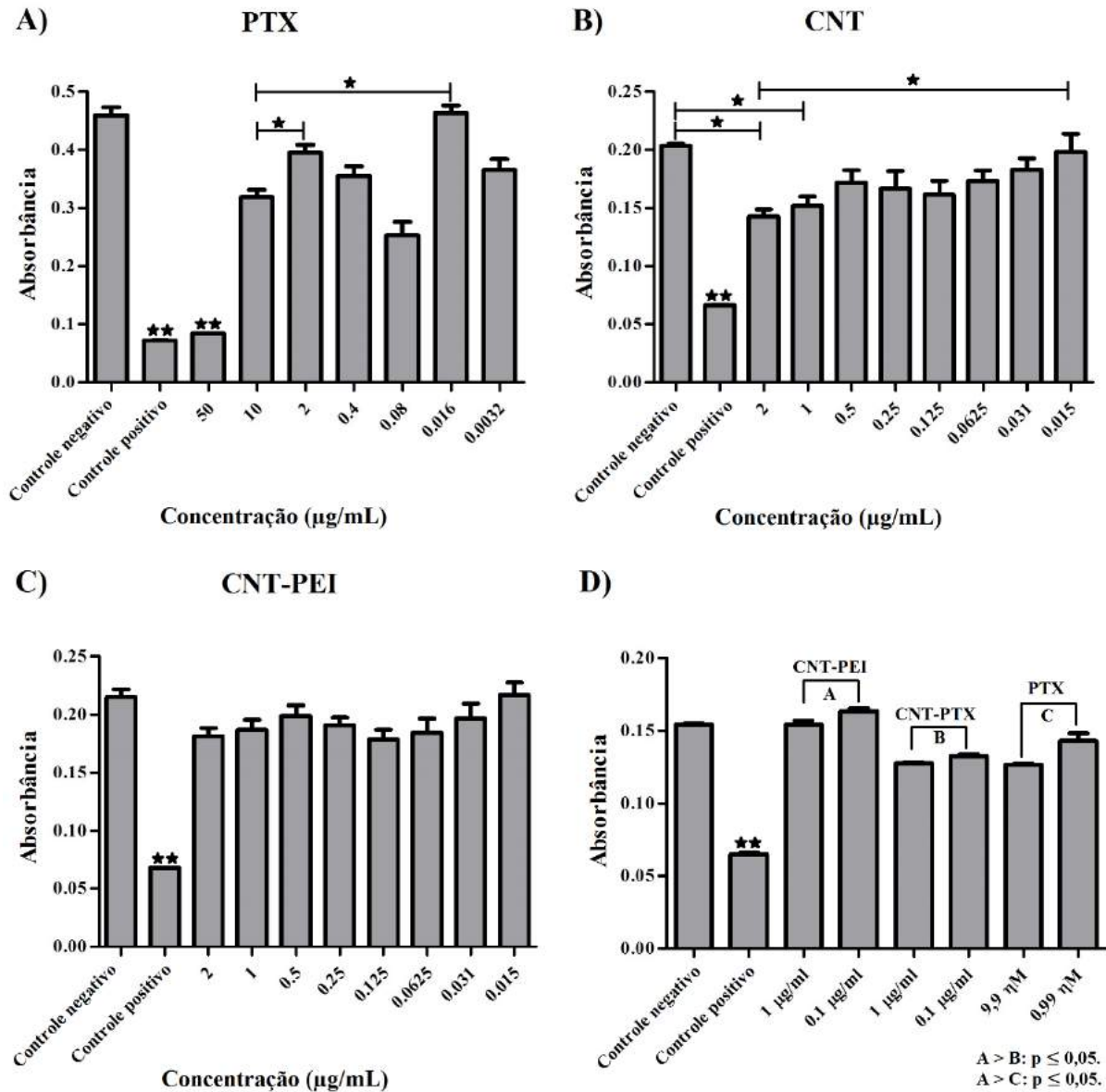


Figura 7 - Citotoxicidade dos nanotubos e paclitaxel em células de câncer prostático (LNCaP) avaliado por ensaio de redução do metil tetrazolio (MTT). LNCaP (1×10^4 células por poço) foram expostas a diferentes concentrações de PTX (A), CNT puro (B) e CNT conjugado com PEI (C) para averiguar sua resposta e estimar a dose de trabalho. O efeito do PTX comparado às nanopartículas (1,0 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) foi comparado com a ação do PTX puro (9,9 e 0,99 nM) e de CNT apenas polimerizado (CNT-PEI) (D). A diferença estatística entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

5.6 CNT-PTX e CNT-PTX-Ab induzem apoptose/necrose de células tumorais LNCaP.

Utilizado para determinar quantitativamente a porcentagem de células que sofreram apoptose, a anexina V é um composto que apresenta afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido exposto na face externa da membrana celular quando a célula se encontra em processo de apoptose. Pelo fato da translocação da fosfatidilserina também ocorrer durante a necrose, utilizamos paralelamente a marcação com 7AAD, que penetra nas células que perderam a integridade da membrana celular. Os dados representados nas Figura 8 e 9 indicam, respectivamente, que nas células de câncer prostático as nanopartículas apresentam baixa toxicidade (com morte celular semelhante ao grupo controle) e quando exposta a 1 µg/ml de CNT-PTX ou CNT-PTX-Ab, as células apresentam o mesmo índice de morte celular ($(7AAD^-/Anexina V^+) = 19,8$; $(7AAD^+/Anexina V^+) = 3,36$ e $(7AAD^-/Anexina V^+) = 20,6$; $(7AAD^+/Anexina V^+) = 3,37$) do que o tratamento com PTX puro ($20,3 \pm 3,41$).

Os nossos resultados indicam que nas concentrações de 1 e 3 µg/ml, os CNTs, carregados com PTX, são capazes de manter o mesmo índice de morte celular que o paclitaxel puro. Porém, a presença do anti-PSMA aparentemente não aumentou a ação citotóxica da nanopartícula nas células, apresentando a mesma porcentagem de células mortas entre os grupos CNT-PTX e CNT-PTX-Ab. O interessante é que na concentração de 5 µg/ml, a presença de anticorpo anti-PSMA na superfície das nanopartículas (CNT-PTX-Ab) induziu maior índice de morte celular ($(7AAD^-/Anexina V^+) = 55,1$; $7AAD^+/Anexina V^- = 6,50$) do que CNT-PTX ou PTX puro.

5.7 A indução de apoptose é dependente da interação com nanopartícula.

Com a intenção de observar melhor a ação da nanopartícula sobre as células tumorais, decidimos marcar os CNTs com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e avaliar a viabilidade celular dentro das populações FITC⁺. Como demonstrado na Figura 10, nos gráficos de tamanho e granulosidade das células (FSC por SSC), observamos que a nanopartícula não conjugada com anticorpo (CNT-PTX-FITC) encontra-se espalhada por toda a população celular, produzindo grande número de células FITC⁺ (população marcada em verde). Diferentemente, no grupo tratado com nanopartículas complexadas com anti-PSMA (CNT-PTX-Ab), a população de células FITC⁺ é coincidente com a região das células em processo apoptótico. A análise por anexina V e 7AAD das populações FITC⁺, demonstrou que nos grupos tratados com CNT-PTX-Ab houve aumento do índice de células mortas ($Anexina V^+$ e $Anexina V^+/7AAD^+$) nas três concentrações avaliadas.

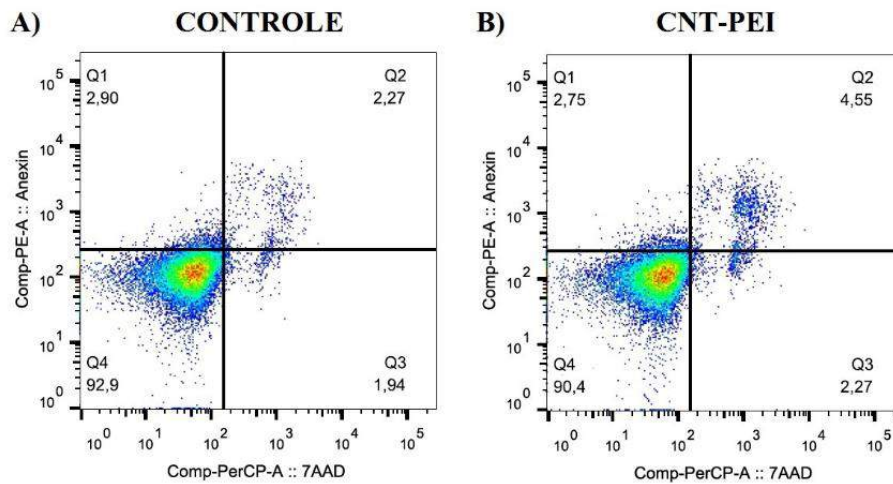


Figura 8 – Viabilidade celular avaliada por marcação com Anexina-V⁺ e 7AAD⁺ (LNCaP) depois de submetidas por 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A) e CNT (conjugado com PEI) (B).

A análise do MFI de uma população marcada com fluorocromo, permite aferir a intensidade de expressão de uma determinada molécula (ou a presença de qualquer outro elemento fluoresceinado) na superfície celular, possibilitando observar as mudanças do marcador entre as populações. Assim, para observar o aumento ou diminuição da interação dos CNT com as células tumorais, decidimos avaliar a MFI nos grupos tratados com CNT-PTX-FITC e CNT-PTX-Ab-FITC nas populações de células FITC⁺. Os valores de MFI das células FITC⁺, indicados na Figura 11, demonstram a presença das nanopartículas nas células de câncer prostático. Observando os resultados, notamos que o MFI nas células tratadas com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab não apresentam modificações, a conjugação do anticorpo não aumentou a quantidade de nanopartícula na superfície celular, com nenhuma diferença significativa entre os grupo sendo observando.

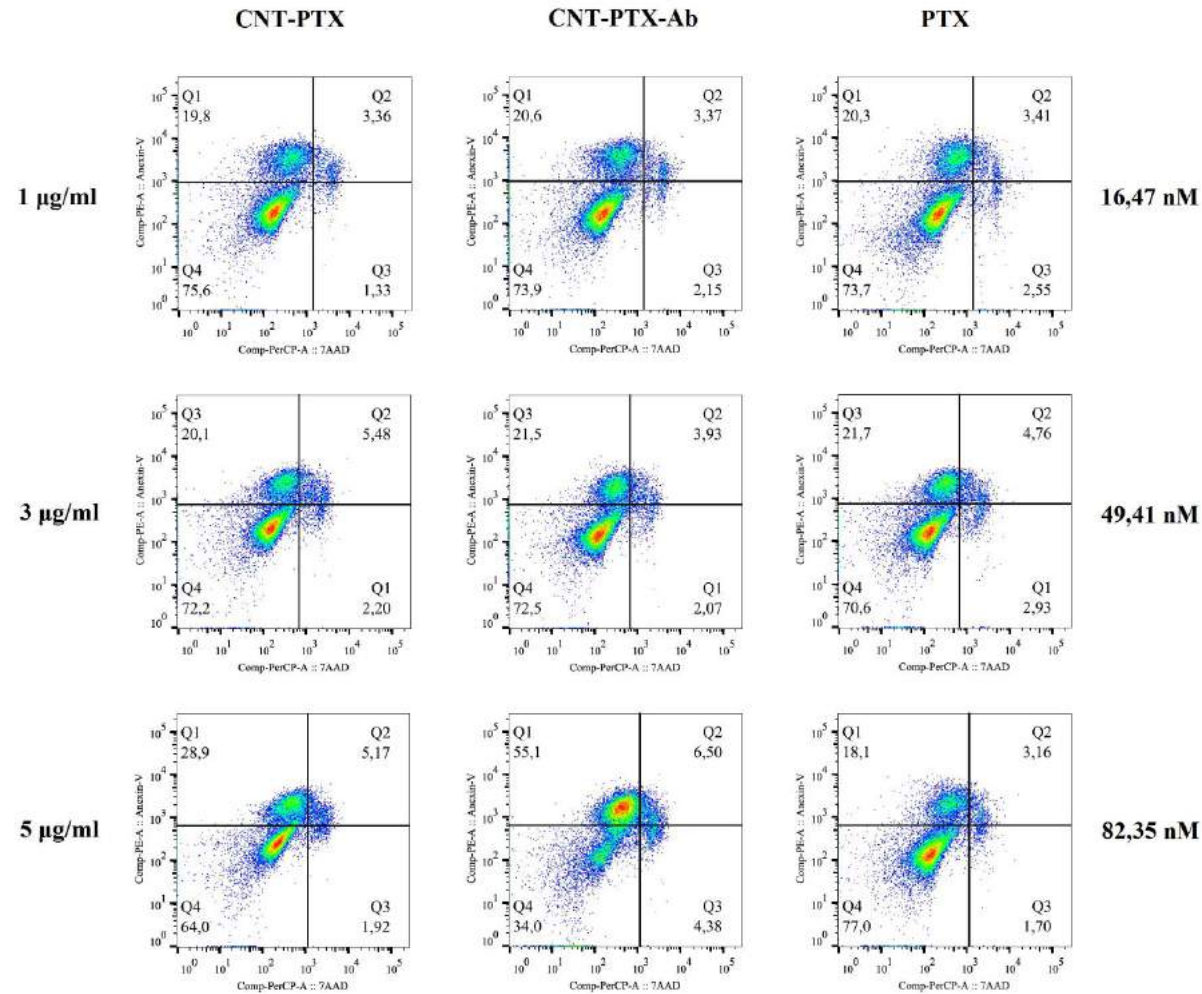


Figura 9 - Viabilidade celular avaliada pela marcação com Anexina-V⁺ e 7AAD⁺ (LNCaP) depois de submetidas por 48h a tratamentos com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab nas concentrações de 1, 3 e 5 µg/ml. A viabilidade celular, também, foi avaliada nas mesmas concentrações molares de PTX que foram carregada pelas nanopartículas nas respectivas concentrações (16,47; 49,41 e 82,35 nM).

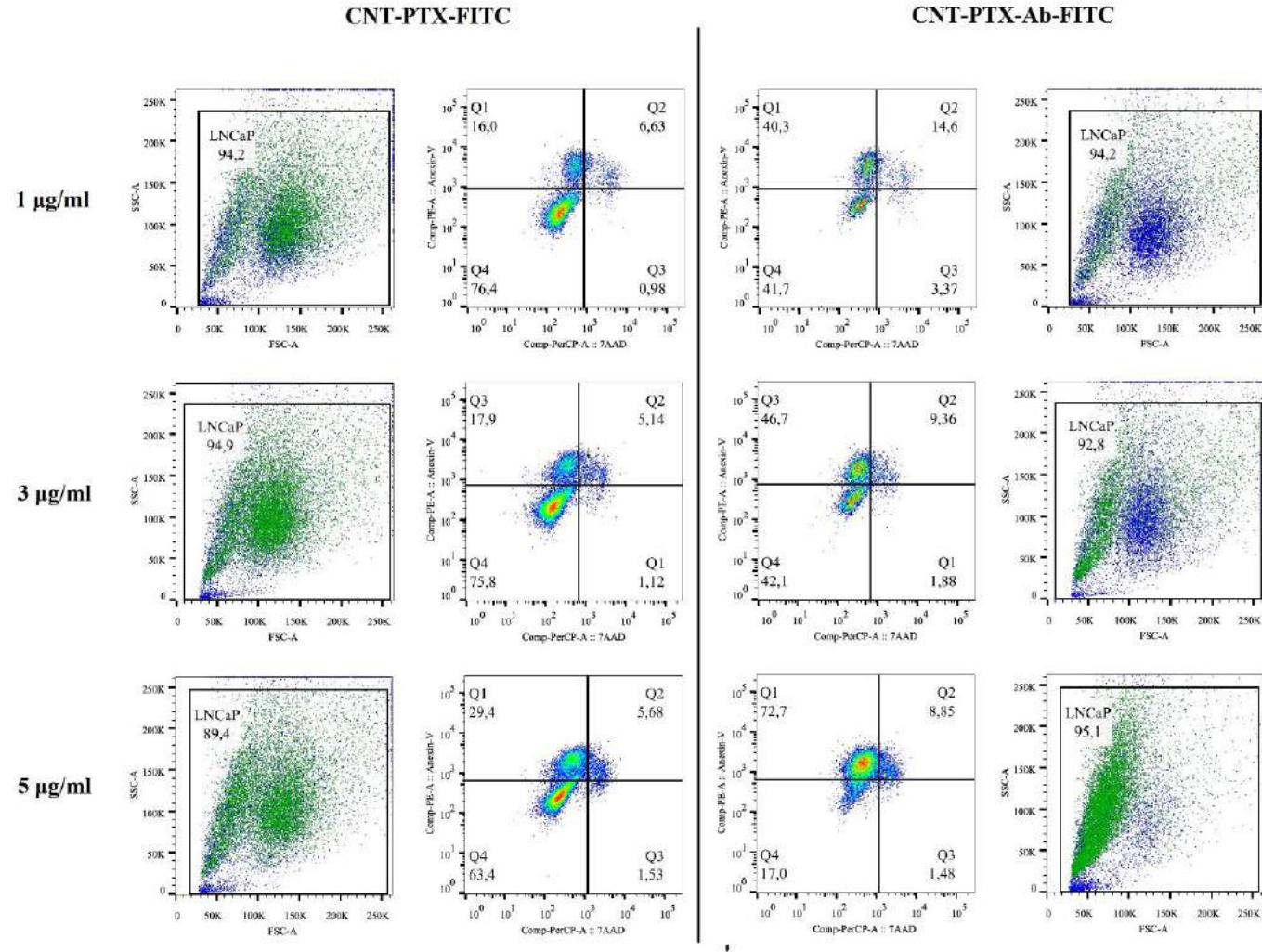


Figura 10 – Incorporação de CNT-PTX-FITC e CNT-PTX-Ab-FITC nas células de câncer prostático (verde) baseados nos parâmetros de tamanho e granulosidade e as respectivas viabilidade celular das células FITC⁺ avaliada por marcação com Anexina-V⁺ e 7AAD⁺ depois de submetidas por 48h aos tratamentos.

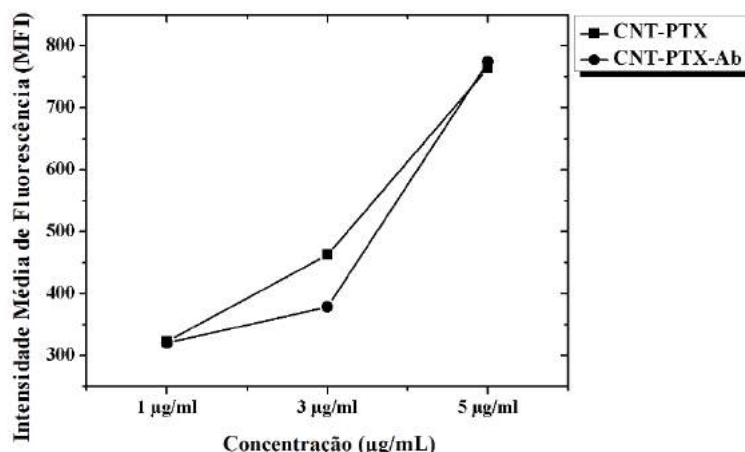


Figura 11 – Intensidade média de fluorescência (MFI) apresentada pela célula tumoral da próstata (LNCaP) depois de tratadas com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab fluoreceinados com FITC, nas concentrações de 1, 3 e 5 µg/ml.

Tais resultados, indicam que o CNT-PTX é capaz de interagir com as células tumorais e desempenhar a mesma toxicidade que o PTX puro. A presença do anticorpo Anti-PSMA na superfície dos CNT (CNT-PTX-Ab) aumenta a toxicidade das nanopartículas, produzindo maiores índices de morte celular entre as células que interagiram com os CNTs.

Decidimos verificar os efeitos das nanopartículas carregadas com PTX nas células de câncer prostático em um intervalo de tempo maior do que 48 horas, expondo-as durante 96h seguida de análise pelo ensaio de Anexina V e 7AAD. Os dados observados na Figura 12 demonstram um aumento significativo de células mortas pelos tratamentos com CNT-PTX ((7AAD⁺/Anexina V⁺) = 96,4) e CNT-PTX-Ab ((7AAD⁺/Anexina V⁺) = 92,2). Os CNTs carregados com PTX se mostraram mais tóxicos para essa linhagem de célula tumoral quando exposta por mais tempo, em comparação com a células tratadas apenas com o fármaco PTX ((7AAD⁺/Anexina V⁺) = 58,9), mas nesse caso, não houve influência da presença dos anticorpos anti-PSMA (CNT-PTX = CNT-PTX-Ab).

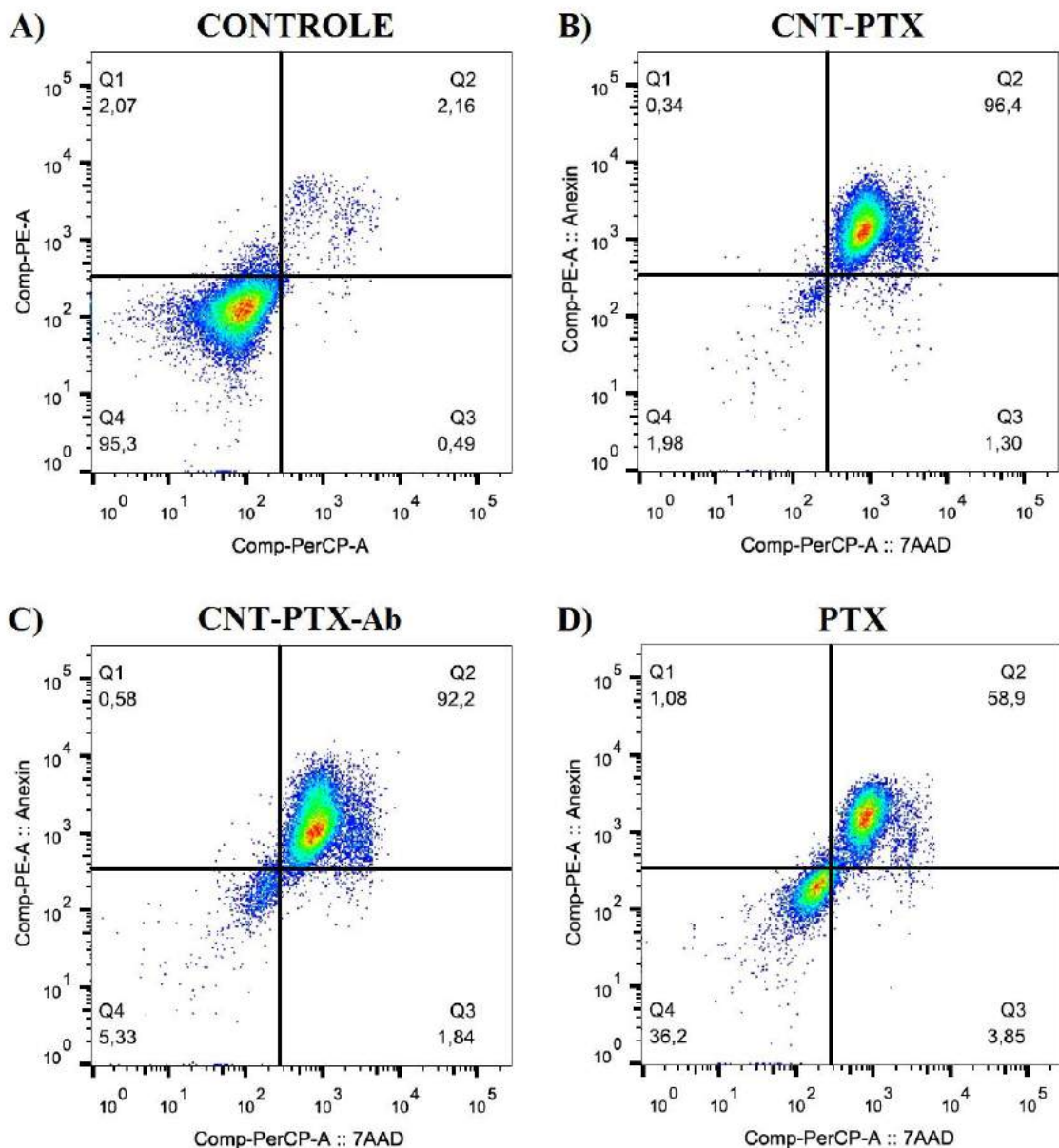


Figura 12 - Análise de viabilidade celular por quadrantes Anexina-V⁺ e 7AAD⁺ das células de câncer prostático (LNCaP) depois de submetidas a 96h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A); CNT-PTX (B); CNT-PTX-Ab (C) e PTX (D).

5.8 Aumento da toxicidade pela presença de anticorpo é específica.

HCT-116 e CACO-2 são linhagens de células de câncer colorretal humano que não expressam o antígeno prostático PSMA (PSMA⁺), escolhida como controle de especificidade do tratamento com CNT-PTX-Ab. Os dados demonstrados na Figura 13 indicam que tanto os CNT-PTX quanto CNT-PTX-Ab foram igualmente tóxicos às células HCT-116 e CACO-2. Nos dois casos, o PTX incorporado aos CNT foi mais tóxico que o quimioterápico puro, porém a presença do anticorpo anti-PSMA não proporciona aumento dessa ação, indicando que, diferentemente das células de câncer prostático, não houve endereçamento das partículas.

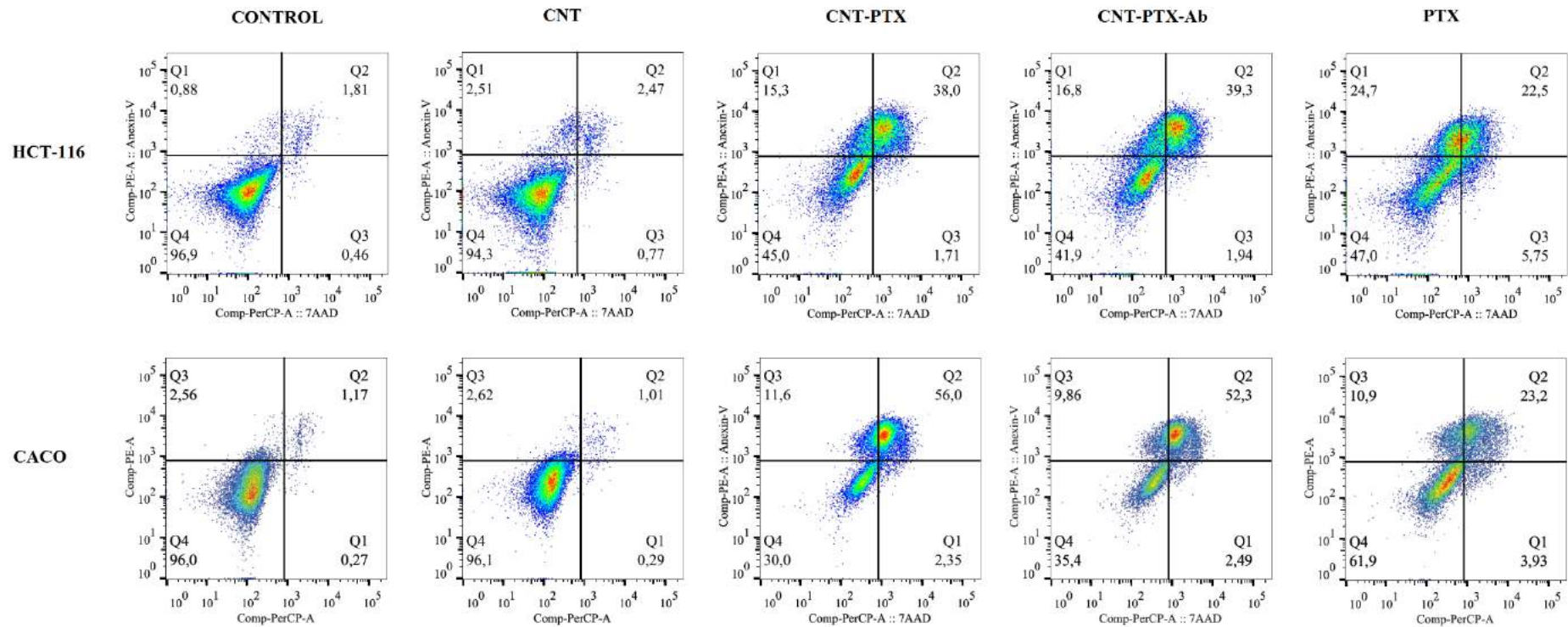


Figura 13 - Análise de viabilidade celular por Anexina-V⁺ e 7AAD⁺ de células de adenocarcinoma de cólon (HCT-116 e CACO-2) depois de submetidas a 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento); CNT (conjugado com PEI); CNT-PTX; CNT-PTX-Ab e PTX.

5.9 Mimetização dos CNT-PTX com anticorpo anti-PSMA (CNT-PTX-Ab) reduz a captura das partículas por monócitos humanos.

Um ponto fundamental no estudo com nanopartículas com potencial de uso terapêutico é a possibilidade de que sejam muito rapidamente fagocitadas por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, limitando a eficiência terapêutica. Assim, avaliamos a interação dos CNT fluoreceinados com monócitos de doadores saudáveis, efetuando a análise por citometria de fluxo. Os resultados representados na Figura 14 demonstram a capacidade das células de sangue periférico em fagocitar grandes quantidades de partículas fluoromarcadas (Figuras 14A e 14B). Ao fazermos uma marcação dupla usando anticorpo monoclonal anti CD14 (marcador característico dos monócitos/macrófagos) observamos que quase a totalidade das células que capturaram as partículas marcadas com FITC são também marcadas pelo anti-CD14 em APC (Figura 14C).

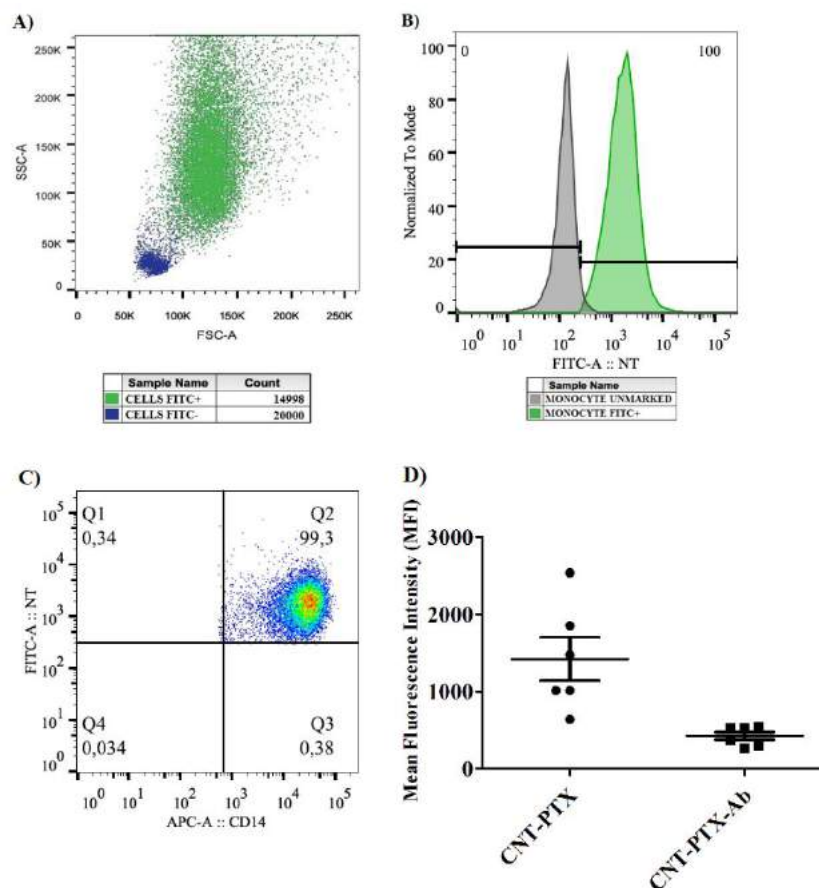


Figura 14 - Incorporação de CNT-FITC em monócitos (A) (verde) baseados nos parâmetros de tamanho e granulosidade. Histogramas demonstrando a porcentagem de monócitos (B) marcadas pelas nanopartículas, nos quais o histograma em verde representa as células FITC⁺ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada. Dupla marcação com FITC e APC (C) demonstrou a incorporação das nanopartículas marcadas com FITC apenas pela população CD14⁺ (marcada em APC). Intensidade média de fluorescência (MFI) apresentada pelos monócitos (n=5) (D) depois de tratadas, por 48h, com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab fluoreceinados com FITC.

Depois de efetuado os tratamentos, os primeiros resultados observados nas células CD14⁺ indicam há presença de estruturas FITC⁺ nas células. Os resultados demonstrados na Figura 14D representam os valores de MFI de isotiocianato de fluoresceína na superfície dos monócitos. Examinando as populações FITC⁺, constatamos que as modificações nas nanopartículas influenciam sua interação com os monócitos, com a presença de anticorpo Anti-PSMA diminuindo o números de estruturas FITC⁺ na superfície celular.

Em vista dessa constatação, perguntamo-nos se tal fenômeno teria repercussão nas características fenotípicas e funcionais de células do sistema imune. Nesse sentido, nosso passo seguinte foi avaliar se a exposição de monócitos humanos às diferentes preparações de nanotubos seria capaz de modificar a expressão de marcadores de superfície presentes na atividade de apresentação de antígenos dessas células.

5.10 Captura de CNT-PTX e CNT-PTX-Ab por monócitos humanos não afeta sua viabilidade.

A análise da incorporação de anexina V (apoptose) e 7AAD (necrose) pelos monócitos indica que apesar da grande quantidade de partículas capturada ou aderidas, os nanotubos carregados com paclitaxel não alteraram a viabilidade dessas células.

Na realidade, observamos que as nanopartículas diminuem o números de células mortas, com índices de apoptose (Figura 15A) e necrose (Figura 15B) abaixo do grupo controle e PTX puro.

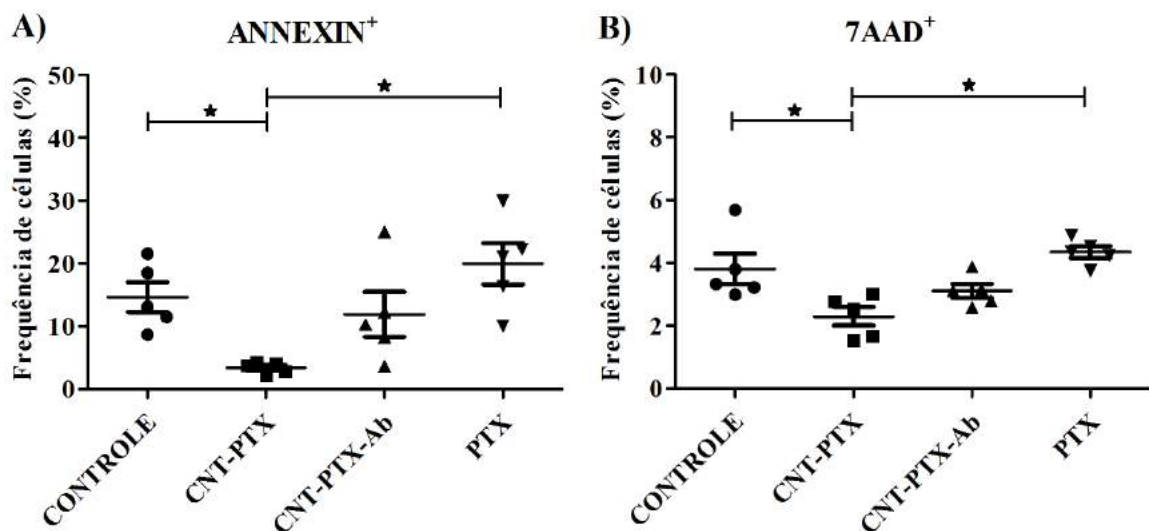


Figura 15 – Citotoxicidade dos CNTs nos monócitos (n=5). Porcentagem de células Anexina-V⁺ (A) e 7AAD⁺ (B) depois de expostas por 48h aos tratamentos com CNT-PTX, CNT-PTX-Ab e PTX. A diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos.

5.11 A incorporação de anti-PSMA nos CNT-PTX reduz o possível efeito supressor dessas partículas.

A Figura 16 ilustra a estratégia de seleção e análise das populações estudadas, partindo dos “singlets” (Figura 16A), seleção da população por tamanho e granulosidade características de monócitos (Figura 16B), exclusão de células mortas 7AAD⁺ (Figura 16C) e seleção de células CD14⁺ dentro da população de células vivas (Figura 16D).

Observamos que apesar de não comprometer a viabilidade dos monócitos, a interação dessas células com CNTs reduziu a frequência de células que expressam moléculas HLA-DR e CD83. Nossos dados indicam que a incorporação de anticorpos anti-PSMA reduz ligeiramente esse efeito, com tendência a restauração da frequência de células. Não observamos efeito direto do PTX puro sobre esse parâmetro. O nanotubos sintetizados com PTX (CNT-PTX e CNT-PTX-Ab) apresentaram uma redução na expressão de HLA-DR e CD83 enquanto os demais tratamentos apresentaram o mesmo perfil de expressão.

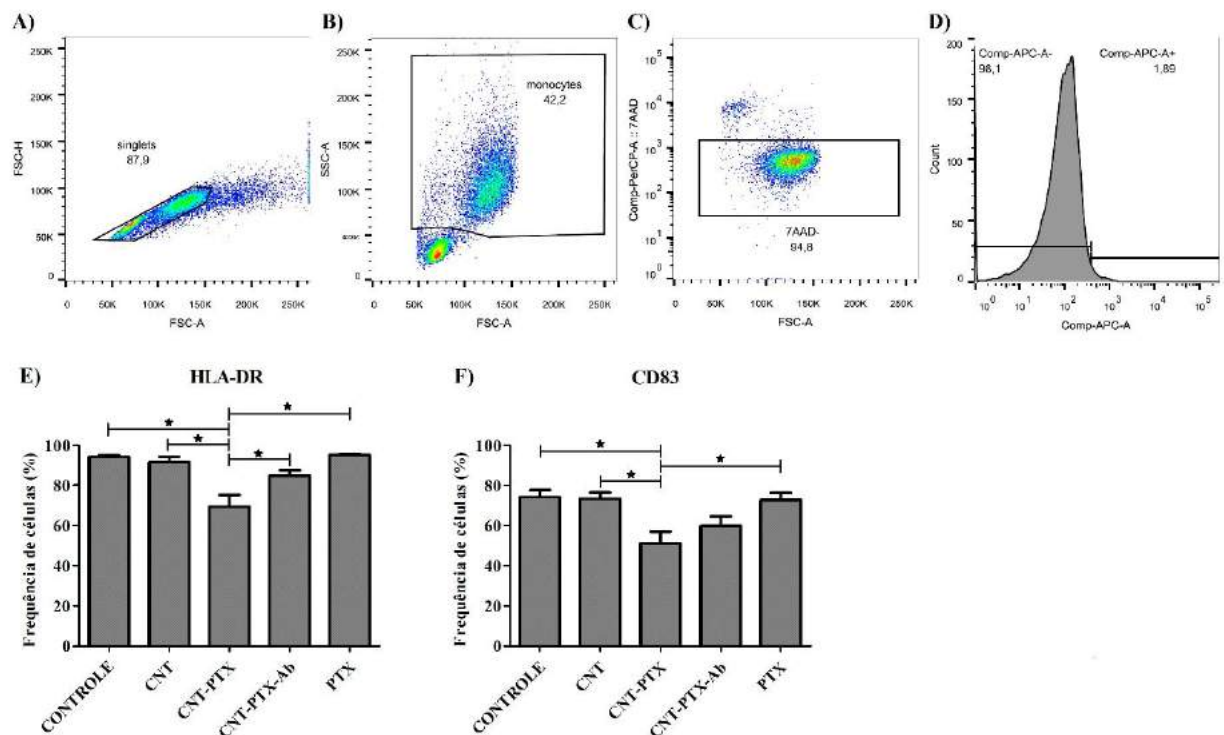


Figura 16 - Estratégia de gating nas análises de monócitos: A) gate singlets representando eventos que passaram individualmente pelo laser; B) gate na população de interesse, baseado em tamanho e granulosidade das células; C) gate feito nos eventos 7AAD⁻ para exclusão das células mortas; D) gate feito dentro da população CD14⁺ para os monócito. Observamos a porcentagem de células que expressam HLA-DR (E) e CD83 (F). Os grupos experimentais foram compostos por CNT, CNT-PTX, CNT-PTX-Ab e PTX. A diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais é apresentada com asteriscos.

6. DISCUSSÃO

A captura de nanocarreadores por células fagocíticas é uma das principais barreiras para melhorar a eficácia terapêutica de nanotubos de carbono. Assim, a conjugação de anticorpos em nanocarreadores de drogas possibilita maior interação das nanopartículas à célula alvo e evita a entrega de medicamentos a tecido sadio (22, 43-45). No presente estudo investigamos o transporte de paclitaxel por nanotubos de carbono, testamos sua especificidade e efetividade a células de câncer prostático após a incorporação de anticorpo anti-PSMA e seus efeitos nas células imunocompetentes.

Nosso primeiro desafio foi manipular os CNT para a incorporação do fármaco e observamos que o revestimento dos CNT com polímero contribuiu para aumentar sua dispersividade em soluções aquosas, ajudando a evitar grandes aglomerações de partículas e possibilitando a conjugação de outras substâncias nas suas paredes (46, 47). Assim, a síntese destes nanocarreadores com polietilenimina e o agente antitumoral paclitaxel foi seguida por caracterizações físicas que demonstraram alterações na sequência de incorporação dos diferentes materiais. Inicialmente, analisamos o espectro de CNT-PEI produzido por FTIR para evidenciar a incorporação do polímero nos CNTs. Esta técnica permite a visualização de regiões que se destacam devido às vibrações moleculares das ligações químicas presentes nas nanopartículas. Especificamente, pudemos observar as regiões de *wavenumber* 1629, 2909 e 3432 cm^{-1} correspondentes às ligações $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ e $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$ presentes nas aminas primárias e secundárias do polímero (22, 40).

As alterações provocadas pela incorporação de PEI foi também evidenciada pelos resultados das análises por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Utilizando a espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (EDX), acoplada ao equipamento de microscopia eletrônica de varredura, foi possível quantificar a presença de nitrogênio na amostra de CNT-PEI, presente apenas na cadeia polimérica. Adicionalmente, a microscopia de transmissão revelou a presença de múltiplas camadas de grafeno enroladas entre si formando um tubo, com paredes externas aparentemente “lisas”, enquanto a conjugação do PEI foi responsável por mudanças estruturais na superfície dos CNT.

Para comprovar a incorporação do quimioterápico na superfície das nanopartículas e estimar as concentrações de CNT e PTX realizamos a espectroscopia UV/Visível (35). Medindo os valores de absorbância dos CNT e PTX nos principais picos de absorção (260 nm CNT e 232 nm PTX) foi possível montar suas respectivas curva-padrão e calcular devidamente a concentração de cada elemento presente na suspensão de CNT-PTX. Assim, confirmamos a

eficácia da incorporação de PTX nos CNTs com uma taxa de incorporação de quimioterápico de 6,34% e concentração estimada de 2.397 μ M. Embora tenhamos menos de 10% de PTX incorporado, é fundamental observar que as nanopartículas demonstraram grande eficácia em matar as células tumorais, indicando que o procedimento adotado não provocou perda de atividade do quimioterápico.

Outra observação importante é que os CNTs puros apresentaram baixa toxicidade nas células LNCaP, enquanto a incorporação de PEI (CNT-PEI) claramente aboliu esta toxicidade. Finalmente, a incorporação de PTX nos CNT apresentaram maior toxicidade para as células LNCaP do que puro PTX na mesma base molar, evidenciando que a ação tóxica é do medicamento e não dos CNT por si só.

O ensaio de apoptoses/necrose confirmou a baixa toxicidade dos CNT, enquanto o complexo CNT-PTX apresentou maior toxicidade do que PTX puro. Com a incorporação de anti-PSMA nas paredes externas dos CNT-PTX, observamos um aumento da toxicidade das nanopartículas nas células, apresentando maiores índices de morte celular (anexina V⁺/7AAD⁺). A presença do anticorpo melhorou a capacidade dos CNT de transportar o quimioterápico e manteve, assim como CNT-PTX, sua função antitumoral por períodos mais longos que PTX puro. Um resultado interessante foi a capacidade das nanopartículas carreadoras de PTX em manter sua atividade antitumoral elevada após 96 horas de incubação. Assim, nossos resultados sugerem que os CNT-PTX poderiam ser mais eficazes que PTX puro a médio e longo prazo. Esse achado é compatível com estudos prévios em que as nanopartículas complexadas com PTX apresentaram toxicidade superior ao tratamento com PTX puro sobre as células HeLa, MCF7 e SKOV3, enquanto os CNTs sozinhos não induziram nenhum efeito citotóxico (48, 49). Os resultados também reforçam o conceito de que as nanopartículas favorecem a interiorização da droga pela célula alvo (50).

A marcação das nanopartículas com FITC permitiu observar, na linhagem de adenocarcinoma de próstata (LNCaP), sua interação com as células tumorais. Os resultados apresentados demonstram uma clara mudança na distribuição de células FITC⁺ quando tratadas com CNT-PTX e CNT-PTX-Ab. Basicamente, após o tratamento com CNT-PTX, as células FITC⁺ estão presentes por toda a população celular. Logo, podemos supor que as nanopartículas interagem com as células tumorais vivas e as conduzem posteriormente a morte celular, marcando indiscriminadamente ambas as populações. Quando tratadas com CNT-PTX-Ab a maioria das células FITC⁺ coincide com as células em processo de apoptose/necrose, com pouca marcação observada nas células vivas. A presença de anti-PSMA na superfície dos CNTs poderia favorecer a entrada das nanopartícula nas células tumorais e, conseqüentemente,

aumentar a ação do quimioterápico. Analisando a indução de apoptose nas células FITC⁺ por Anexina e 7AAD, observamos que as células incubadas com CNT-PTX-Ab apresentam maior índice de morte celular do que as tratadas com CNT-PTX, demonstrando maior efetividade no transporte do quimioterápico.

Resultados inesperados foram obtidos quando as CNT-PTX e CNT-PTX-Ab foram adicionadas às culturas de células de câncer colorretal HCT-116 e CACO-2. Por se tratarem de células não prostáticas e, portanto, destituídas de PSMA (51) em sua superfície, esperávamos a ausência ou baixa atividade citotóxica dessas duas preparações de CNT. Entretanto, para nossa surpresa, as partículas apresentaram atividade citotóxica elevada, maior até do que a observada em células prostática LNCaP. Visto que o revestimento do anticorpo anti-PSMA nas partículas (CNT-PTX-Ab) não favorecem a apoptose ou necrose das células colorretais, concluímos que essas linhagens podem estar interagindo mais intensamente com os nanotubos que as células prostáticas, talvez por expressarem maior densidade de moléculas de adesão. Outra possibilidade é que as células colônicas sejam mais sensíveis à ação do paclitaxel do que as prostáticas e que os nanotubos sinergizam a ação do PTX, visto que a droga pura apresenta efeito inferior às partículas carregadas. De qualquer forma, é relevante frisar que os resultados comprovam a especificidade dos anticorpos usados e mostram que, havendo o alvo apropriado, o endereçamento se mostra eficiente, como observado com as células LNCaP. Em estudos prévios do grupo, observou-se que essa linhagem tumoral exposta à baixas concentrações de paclitaxel aumentam a expressão de proteínas diversas, incluindo antígenos tumorais de tecidos não associados, como os do tumor de Wilm e antígenos de câncer de mama (52). Assim, não podemos descartar a possibilidade de que o estresse celular provocado nessas células, pela exposição ao PTX associado ao CNT, tenha induzido a expressão de antígenos PSMA, permitindo seu reconhecimento pelos anticorpos de revestimento dos CNT.

Os nanotubos podem ser intensamente fagocitado pelos monócitos, mas as partículas sem funcionalização não interferem na expressão de moléculas co-estimuladoras ou imunossupressoras nessas células, nem em células dendríticas ou linfócitos (53, 54). Nossos resultados demonstram a presença dos CNTs na superfície dos monócitos, a redução da intensidade média de fluorescência (MFI) das células tratadas com CNT-PTX-Ab-FITC, indica que a conjugação de anti-PSMA nos nanotubos reduzem sua adesão na parede celular dos monócitos.

A análise da MFI normalizada pelos valores do grupo controle, indica que tanto os CNT polimerizados quanto o PTX puro aumentam a expressão de HLA-DR. O efeito de PTX na expressão de HLA-DR não é uma surpresa, uma vez que este grupo já observou anteriormente

que baixas concentrações de agentes antineoplásicos, como paclitaxel, são capazes de modular de forma positiva a expressão de marcadores de ativação de maturação de células dendríticas (55), aumentando a sua capacidade de desencadear uma resposta anti-tumoral invitro (56, 57). Da mesma forma que a incorporação dos CNT-PTX diminuíram a expressão de HLA-DR, também foram capazes de diminuir a expressão de moléculas CD83 nas células. Tanto HLA-DR quanto CD83 estão envolvidos na apresentação de antígenos por macrófagos e na liberação de sinais co-estimulatórios nas células dendríticas (57, 58), sendo fundamentais para apresentar peptídeos antigênicos para as células T CD4⁺, após processamento pela via endocítica. Uma vez que o PTX interfere na organização de microtúbulos durante a divisão celular (6), a diminuição da expressão de HLA-DR pelas células tratadas com CNT-PTX parece ser devida ao efeito das partículas no processamento de antígenos, montagem e apresentação dos peptídeos associados ao MHC, necessários para a expressão de MHC de classe II na superfície da célula.

7. CONCLUSÃO

Tomando em conjunto, nossos resultados nos levam a concluir que os nanotubos de carbono são eficientes carreadores de paclitaxel para células de câncer prostático e linhagens de câncer colorretal, capaz de produzir efeitos citotóxicos semelhantes ou superiores ao quimioterápico puro. A conjugação com anti-PSMA favorece a internalização das nanopartículas pelas células LNCaP, aumentando a ação do CNT-PTX sobre as células de câncer prostático. Embora altamente fagocitados pelos monócitos e capazes de inibir a expressão de HLA-DR e CD83, as partículas de CNT-PTX não mostraram toxicidade para as células de defesa. Assim, os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para compreender melhor a ação dos CNTs como agente carreador de drogas e seus principais efeitos nas células de câncer prostático e células imunocompetentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Francini E, Taplin ME. Prostate cancer: Developing novel approaches to castration-sensitive disease. *Cancer*. 2017;123(1):29-42.
3. Gravis G, Audenet F, Irani J, Timsit MO, Barthelemy P, Beuzeboc P, et al. Chemotherapy in hormone-sensitive metastatic prostate cancer: Evidences and uncertainties from the literature. *Cancer treatment reviews*. 2016.
4. Lavery HJ, Cooperberg MR. Clinically localized prostate cancer in 2017: A review of comparative effectiveness. *Urologic oncology*. 2017;35(2):40-1.
5. Lemieux J, Maunsell E, Provencher L. Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *Psycho-oncology*. 2008;17(4):317.
6. Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 2004;23(11):2016-27.
7. Brito DA, Yang Z, Rieder CL. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *The Journal of cell biology*. 2008;182(4):623-9.
8. Castel M, Despas F, Modesto A, Gales C, Honton B, Galinier M, et al. [Cardiotoxicity of chemotherapies]. *Presse medicale*. 2013;42(1):26-39.
9. Pieniazek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwozdziński K, Koceva-Chyla A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Advances in medical sciences*. 2013;58(1):104-11.
10. Turkoglu S, Simsek V, Abaci A. Possible anaphylactic reaction to taxus stent: a case report. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. 2005;66(4):554-6.
11. Breidenbach M, Rein DT, Schondorf T, Schmidt T, König E, Valter M, et al. Hematological side-effect profiles of individualized chemotherapy regimen for recurrent ovarian cancer. *Anti-cancer drugs*. 2003;14(5):341-6.
12. 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.
13. Cao X, Tao L, Wen S, Hou W, Shi X. Hyaluronic acid-modified multiwalled carbon nanotubes for targeted delivery of doxorubicin into cancer cells. *Carbohydrate research*. 2015;405:70-7.

14. Weng X, Wang M, Ge J, Yu S, Liu B, Zhong J, et al. Carbon nanotubes as a protein toxin transporter for selective HER2-positive breast cancer cell destruction. *Molecular BioSystems*. 2009;5(10):1224-31.
15. Hu S, Wang T, Pei X, Cai H, Chen J, Zhang X, et al. Synergistic Enhancement of Antitumor Efficacy by PEGylated Multi-walled Carbon Nanotubes Modified with Cell-Penetrating Peptide TAT. *Nanoscale research letters*. 2016;11(1):452.
16. Ren J, Shen S, Wang D, Xi Z, Guo L, Pang Z, et al. The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angioprep-2. *Biomaterials*. 2012;33(11):3324-33.
17. Zhang H, Hou L, Jiao X, Yandan J, Zhu X, Hongji L, et al. In vitro and in vivo evaluation of antitumor drug-loaded aptamer targeted single-walled carbon nanotubes system. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2014;14(13):1105-17.
18. Xiao Y, Gao X, Taratula O, Treado S, Urbas A, Holbrook RD, et al. Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC cancer*. 2009;9:351.
19. 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.
20. Naderi N, Madani SY, Mosahebi A, Seifalian AM. Octa-ammonium POSS-conjugated single-walled carbon nanotubes as vehicles for targeted delivery of paclitaxel. *Nano reviews*. 2015;6.
21. Al Faraj A, Shaik AS, Ratemi E, Halwani R. Combination of drug-conjugated SWCNT nanocarriers for efficient therapy of cancer stem cells in a breast cancer animal model. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;225:240-51.
22. Wu H, Shi H, Zhang H, Wang X, Yang Y, Yu C, et al. Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery. *Biomaterials*. 2014;35(20):5369-80.
23. Diamandis EP. Prostate-specific Antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 1998;9(8):310-6.
24. Filella X, Foj L. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
25. Yi HJ, Ghosh D, Ham MH, Qi JF, Barone PW, Strano MS, et al. M13 Phage-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes As Nanoprobes for Second Near-Infrared Window Fluorescence Imaging of Targeted Tumors. *Nano Lett*. 2012;12(3):1176-83.
26. Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(7):2586-91.

27. Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP. Monoclonal-Antibodies to a New Antigenic Marker in Epithelial Prostatic Cells and Serum of Prostatic-Cancer Patients. *Anticancer Res.* 1987;7(5):927-36.
28. Wright GL, Jr., Haley C, Beckett ML, Schellhammer PF. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic oncology.* 1995;1(1):18-28.
29. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1997;57(12):2321-4.
30. Nomura N, Pastorino S, Jiang PF, Lambert G, Crawford JR, Gymnopoulos M, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. *Cancer Cell Int.* 2014;14.
31. Ross JS, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RP, Kaur P, Gray K, et al. Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6357-62.
32. Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.* 1999;59(13):3192-8.
33. Barwe SP, Maul RS, Christiansen JJ, Anilkumar G, Cooper CR, Kohn DB, et al. Preferential association of prostate cancer cells expressing prostate specific membrane antigen to bone marrow matrix. *International journal of oncology.* 2007;30(4):899-904.
34. Osorio AG, Silveira ICL, Bueno VL, Bergmann CP. H₂SO₄/HNO₃/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Appl Surf Sci.* 2008;255(5):2485-9.
35. Tian Z, Shi Y, Yin M, Shen H, Jia N. Functionalized multiwalled carbon nanotubes-anticancer drug carriers: synthesis, targeting ability and antitumor activity. *Nano Biomedicine & Engineering.* 2011;3(3).
36. Huang J-H, Hong Y-J, Chang Y-T, Chang P, Yew T-R. Carbon nanotubes for highly sensitive colorimetric immunoassay biosensor. *Journal of Materials Chemistry B.* 2013;1(40):5389-92.
37. Mantha S, Pedrosa VA, Olsen EV, Davis VA, Simonian AL. Renewable nanocomposite layer-by-layer assembled catalytic interfaces for biosensing applications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids.* 2010;26(24):19114-9.
38. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, Cheng HKF, et al. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications.* 2011;47(18):5235-7.

39. Pourfayaz F, Boroun S, Babaei J, Ebrahimi Hoseinzadeh B. An Evaluation of the Adsorption Potential of MWCNTs for Benzene and Toluene Removal. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;10(1):27-34.
40. Zhang X, Zhang X, Yang B, Yang Y, Chen Q, Wei Y. Biocompatible fluorescent organic nanoparticles derived from glucose and polyethylenimine. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2014;123:747-52.
41. Mombeshora ET, Simoyi R, Nyamori VO, Ndungu PG. Multiwalled carbon nanotube-titania nanocomposites: Understanding nano-structural parameters and functionality in dye-sensitized solar cells. *South African Journal of Chemistry*. 2015;68:153-64.
42. Li Z, Luo G, Zhou W, Wei F, Xiang R, Liu Y. The quantitative characterization of the concentration and dispersion of multi-walled carbon nanotubes in suspension by spectrophotometry. *Nanotechnology*. 2006;17(15):3692.
43. Chen J, Chen S, Zhao X, Kuznetsova LV, Wong SS, Ojima I. Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(49):16778-85.
44. Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, Dai H. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS nano*. 2007;1(1):50-6.
45. Zeineldin R, Al-Haik M, Hudson LG. Role of polyethylene glycol integrity in specific receptor targeting of carbon nanotubes to cancer cells. *Nano letters*. 2009;9(2):751-7.
46. Byrne MT, McNamee WP, Gun'ko YK. Chemical functionalization of carbon nanotubes for the mechanical reinforcement of polystyrene composites. *Nanotechnology*. 2008;19(41):415707.
47. Ma P-C, Siddiqui NA, Marom G, Kim J-K. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: a review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2010;41(10):1345-67.
48. Lay CL, Liu HQ, Tan HR, Liu Y. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology*. 2010;21(6):065101.
49. Sobhani Z, Dinarvand R, Atyabi F, Ghahremani M, Adeli M. Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:705-19.
50. Kumar S, Rani R, Dilbaghi N, Tankeshwar K, Kim KH. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. *Chemical Society reviews*. 2017;46(1):158-96.
51. Lu S-H, Tsai W-S, Chang Y-H, Chou T-Y, Pang S-T, Lin P-H, et al. Identifying cancer origin using circulating tumor cells. *Cancer biology & therapy*. 2016;17(4):430-8.

52. Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cellular oncology*. 2011;34(2):97-106.
53. Delogu LG, Venturelli E, Manetti R, Pinna GA, Carru C, Madeddu R, et al. Ex vivo impact of functionalized carbon nanotubes on human immune cells. *Nanomedicine*. 2012;7(2):231-43.
54. Orecchioni M, Bedognetti D, Sgarrella F, Marincola FM, Bianco A, Delogu LG. Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells. *Journal of translational medicine*. 2014;12(1):1.
55. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *Journal of immunology*. 2009;183(1):137-44.
56. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(9):1141-51.
57. Shurin GV, Amina N, Shurin MR. Cancer therapy and dendritic cell immunomodulation. *Dendritic Cells in Cancer*: Springer; 2009. p. 201-16.
58. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *European journal of immunology*. 2007;37(3):686-95.

Nota:

O capítulo 3 refere-se aos resultados obtido em estudos desenvolvidos paralelamente ao apresentado no cap. 2. Assim, grande parte da metodologia apresentada é similar à descrita no capítulo anterior, mas optamos por repeti-las, ao invés de fazer simples referência ao texto anterior, para dar mais dinâmica à leitura e por se tratar de manuscrito independente do texto prévio.

**CAPITULO 3: ENTREGA DE PACLITAXEL POR NANOTUBOS DE CARBONO
REVESTIDOS COM GLICOSE A CÉLULAS DE CÂNCER PROSTÁTICO E
CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES**

Resumo

Os nanotubos de carbono (CNT) podem ser carregados com fármacos antitumorais, de modo a direcionar sua liberação dentro das células tumorais. Considerando o alto metabolismo dessas células, CNT foram carregados com paclitaxel (PTX) e revestidos com moléculas de glicose (GLI), a fim de testar sua toxicidade em células de câncer prostático e células imunocompetentes. A atividade citotóxica nas células de câncer de próstata (LNCaP) foi confirmada por citometria de fluxo após 48 horas de incubação com as nanopartículas. A análise da viabilidade celular baseou-se na marcação por anexina V (apoptose) e 7-aminoactinomicina D (7AAD = morte celular) em cinco condições experimentais: a) CNT; b) CNT-PTX; c) CNT-GLI; d) CNT-GLI-PTX, e e) PTX puro. As nanopartículas carregadas com PTX (CNT-PTX) apresentaram atividade citotóxica semelhante ao PTX puro, que foi significativamente superior ao CNT sozinho ou CNT-GLI. O resultado mais interessante foi observado no grupo CNT-GLI-PTX, que apresentou efeito citotóxico superior ao PTX puro e ao CNT-PTX, indicando que a glicose favorece a interação da partícula com as células tumorais. Também analisamos os efeitos dos CNT na viabilidade e no fenótipo de monócitos e células dendríticas (DC) expostas às preparações de CNT. Observamos que CNT-PTX e CNT-GLI-PTX aumentaram a expressão de PD-L1 e reduziram a expressão de HLA-DR nos monócitos, enquanto as demais moléculas CD80, CD86 e CD83 não foram alteradas de modo relevante. As células dendríticas (DC) desafiadas com CNT-GLI-PTX mostraram aumento da expressão de CD86 e HLA-DR, mas sua habilidade de induzir a proliferação de linfócitos no ensaio de reação mista de leucócitos (MLR), foi prejudicada por essa preparação de nanopartículas. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que o revestimento dos nanotubos com glicose favorece sua interação com células tumorais, mas as torna mais atraentes também para os monócitos e células dendríticas, interferindo em seu papel de células apresentadoras de antígenos.

Abstract

Carbon nanotubes (CNT) can be loaded with antitumor drugs in order to release them inside tumor cells. Considering the high metabolic activity of these cells, CNT were loaded with paclitaxel (PTX), and covered with glucose (GLU) to test their toxicity on prostate cancer cells and on immunocompetent cells. Apoptotic activity against tumor cells LNCaP, was confirmed by flow cytometry 48h after cell incubation with different CNT preparations. Analysis of cell viability was based on cell labelling with annexin V (apoptosis) and 7-aminoactinomycin-D (7-AAD = necrosis), after cell incubation with: a) CNT; b) CNT-PTX; c) CNT-GLI; d) CNT-GLI-PTX, e) pure PTX. Cytotoxic activity of nanoparticles loaded with PTX (CNT-PTX) was similar to pure PTX and higher than CNT alone or CNT-GLU. The more relevant result was that CNT-GLU-PTX preparation showed higher cytotoxic effect than pure PTX or CNT-PTX, indicating that glucose enhances the interaction of nanoparticles with tumor cells. We also analyzed the effect of different preparations on the viability and phenotype of human monocytes and dendritic cells (DC). We observed that CNT-PTX and CNT-GLU-PTX increased the expression of PD-L1 and decreased HLA-DR molecules, while non-relevant effects were observed on CD80, CD86 and CD83. DC challenged with CNT-GLU-PTX showed increased expression of CD 86 and HLA-DR, but their ability to induce lymphocyte proliferation in a mixed leukocyte reaction (MLR) was impaired by these nanoparticles. Taken together, our results indicate that covering nanotubes with glucose enhances their interaction with tumor cells, but also make them more attractive for monocytes and DC, interfering with their role as antigen presenting cells.

Lista de Figuras

Figura 1 - Cronograma de um ensaio de Reação Mista de Linfócitos (MLR). Depois de colher sangue e dar estímulo para os monócitos se diferenciarem em DCs, as células foram expostas aos CNTs no 5º dia, no 7º dia as DCs foram fenotipadas e incubadas com linfócitos e observado seu perfil de proliferação no 12º dias.....94

Figura 2—Caracterização dos nanotubos de carbono por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises dos espectros de FTIR das amostras de CNT puro, CNT hidroxilado (CNT-COOH), CNT conjugado com polímero (CNT-PEI) e CNT conjugado com polímero e glicose (CNT-GLI), indicaram os principais componentes das nanopartículas depois de submetidas aos tratamentos com ácido sulfúrico/ácido nítrico e incorporação de polímeros. A incorporação do polímero polietilenimina (PEI) nas nanopartículas (CNT-PEI e CNT-GLI) é observada pela presença de vibrações moleculares, características, de grupos amins (regiões 2-5).....95

Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de (A) CNT puro, (B) CNT conjugados com PEI e (C) CNT conjugado com PEI-GLI em dois diferentes aumentos.....97

Figura 4 - Incorporação de CNT-FITC e CNT-GLI-FITC em células de câncer prostático e monócitos. Histogramas demonstrando a porcentagem de células de câncer prostático FITC⁺ depois de incubadas por 48h com CNT-FITC (A) e CNT-GLI-FITC (B), nos quais o histograma em verde representa as células FITC⁺ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada. Histogramas demonstrando a porcentagem de monócitos FITC⁺ depois de incubadas por 48h com CNT-FITC (C) e CNT-GLI-FITC (D).....98

Figura 5 - Análise de apoptose (anexina-V⁺ nos quadrantes superiores direito e esquerdo) e necrose, pela marcação com e 7AAD⁺ (nos quadrantes superior e inferior direitos) das células de câncer prostático (LNCaP) depois de submetidas a 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A); CNT (B); CNT-GLI (C); CNT-PTX (D); CNT-GLI-PTX (E) e PTX (F). Os dados apresentados nas Figuras 5G e 5H representam as porcentagens de monócitos (n=5) e células dendríticas nos (n=3) 7AAD⁺, respectivamente. Demonstrando a citotoxicidade dos CNTs, depois de expostas por 48h aos tratamentos com CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX.....100

Figura 6 - Estratégia de gating nas análises de monócitos e células dendríticas (DCs): A) gatesinglets representando eventos que passaram individualmente pelo laser; B) gate na população de interesse, baseado em tamanho e granulosidade das células; C) gate feito nos eventos 7AAD⁻ para exclusão das células mortas; D) gate feito dentro da população CD14⁺ para os monócitos. Observamos a porcentagem de células que expressam HLA-DR (E), e sua respectiva intensidades médias de fluorescências (MFI) (F), e PD-L1 (G). Os grupos experimentais foram compostos por CNT, CNT-PTX, CNT-GLI, CNT-GLI-PTX e PTX.....101

Figura 7 - Histogramas demonstrando a expressão de CD19 (A), PD-1 (B) e CD25 (C) na superfície de linfócitos expostos a CNT, CNT-PTX, CNT-GLI, CNT-GLI-PTX e PTX.....102

Figura 8 - Fenótipo de DCs depois de submetidos a diferentes tratamentos. Foi observada a porcentagem de células que expressão CD86⁺ (A), HLA-DR⁺ (B) e CD80⁺ (C) e suas respectivas intensidades médias de fluorescências (MFI) (D e E). O grupo Controle mDC representa DCs que foram tratadas com coquetel de ativação para se diferenciarem em DCs maduras (mDC) e o Controle iDC representa as DCs que não receberam nenhum tratamento.....103

Figura 9 - Linfócitos totais marcados com CFSE foram estimulados por 5 dias pelas DCs, previamente tratadas com os CNTs, a fim de averiguar sua capacidade de induzir a proliferação de células T. A análise foi baseada em estratégia de *gating* selecionando as células por: A) tamanho e granulosidade; B) eventos CD3⁺; C) proliferação eventos CD3⁺; D) proliferação eventos CD3⁺/CD4⁺; E) proliferação eventos CD3⁺/CD8⁺. A proliferação dos linfócitos T totais, incubados com DCs previamente submetidas a tratamentos com CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX, foram quantificadas em porcentagem de células CD3⁺(F). (n=3).....104

Figura 10—Análise de proliferação de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺/CD4⁺) (A) e linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺/CD8⁺) (B) por citometria de fluxo. Os linfócitos foram co-cultivados, durante 5 dias, com células dendríticas (DCs) previamente tratadas com coquetel de ativação (Controle mDC), sem tratamento (Controle iDC), CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX. (n=3).....105

Lista de Tabelas

Tabela 1: Moléculas analisadas na superfície de monócitos e células dendríticas com seus respectivos marcadores.....93

Tabela 2: Principais componentes das vibrações moleculares detectadas por FTIR nas amostras de CNTs.....96

Sumário

1. INTRODUÇÃO	86
2. OBJETIVO	88
3. METODOLOGIA	89
3.1 Oxidação dos nanotubos de carbono	89
3.2 Modificação dos CNT com polietilenimina (PEI)	89
3.3 Marcação do CNT-PEI com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células	89
3.4 Incorporação de CNT por células de câncer prostático e células mononucleares	90
3.5 Incorporação de paclitaxel aos CNT (CNT-PTX)	90
3.6 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	90
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	90
3.8 Cultura de células tumorais	91
3.9 Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo	91
3.10 Cultura de monócitos humanos	91
3.11 Diferenciação <i>in vitro</i> de células dendríticas	92
3.12 Fenotipagem de monócitos e DCs expostos aos CNT	92
3.13 Reação mista de linfócitos (MLR)	93
3.14 Análise estatística	94
4. RESULTADOS	95
4.1 Caracterização das nanopartículas por FTIR	95
4.2 Alteração morfológica dos CNT induzida pela incorporação de materiais	96
4.3 Nanotubos de carbono interagem com células de câncer prostático e com monócitos de sangue periférico	97
4.4 Citotoxicidade dos CNT-PTX e CNT-GLI-PTX em células tumorais LNCaP, monócitos e células dendríticas	99
4.5 Efeito dos CNT sobre o fenótipo dos monócitos de doadores saudáveis	101
4.6 Preparação de CNT não afetam o fenótipo de linfócitos e de células dendríticas	102
4.7 CNT-GLI-PTX reduz a capacidade de estimulação alogênicas DC	103
5. DISCUSSÃO	106
6. CONCLUSÃO	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1. INTRODUÇÃO

As células cancerígenas apresentam crescimento rápido e desordenado, elevando sua atividade metabólica e tornando o gasto energético superior ao das células normais (1). Para manter o crescimento celular, as células tumorais necessitam produzir grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP) e uma das principais formas de suprir a necessidade energética é o aumento da atividade da via glicolítica (2). A expressão de catalizadores da via glicolítica são maiores nessas células (3), tornando o consumo de glicose mais elevado que nas células normais (1). A captação de glicose pelas células, ocorre por uma variedade de proteínas de membrana capazes de modular a cinética de seu transporte de acordo com a necessidade energética (4). Os transportadores de glicose Gluts (*glucose transporters*) são encontrados em todas as células do organismo, sendo responsáveis pelo transporte das moléculas de glicose para dentro e para fora das células (4). Nas células tumorais, observou-se a importância da presença dos GLUT-1 e 3, como receptores fundamentais para manter o crescimento celular acelerado e garantir uma reserva energética para as células (5, 6).

Desde 1970, através de técnicas como tomografia por emissão de pósitrons (PET), o consumo elevado de glicose por células com alta atividade metabólica é utilizado como estratégia para o diagnóstico de doenças ou anomalias no organismo (7), mas ainda hoje pouco utilizada na clínica para tratamento de neoplasias.

Entre os desafios da nanomedicina, está o desenvolvimento de técnicas que permitam o endereçamento adequado de nanocarreadores de drogas para órgãos ou células selecionadas. O direcionamento de fármacos, vitaminas e proteínas por nanocarreadores às células de interesse pode ser feito pela fixação de ligantes específicos, como biomarcadores característicos da linhagem celular, à superfície das estruturas. Assim, o consumo elevado de carboidratos pelas células tumorais pode ser utilizado para direcionar a ação das nanopartículas as células com alta atividade metabólica (8). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que moléculas de glicose conjugadas a nanopartículas metálicas aumentaram sua absorção por células de câncer de mama (MCF-7) (9).

O direcionamento de fármacos, usualmente utilizados na quimioterapia, por nanopartículas conjugadas com moléculas de glicose, reduz a ação citotóxica dos quimioterápicos nos tecidos saudáveis, bem como a captura das nanopartículas por células com baixa atividade metabólica (10, 11). Por exemplo, nanopartículas de quitosana conjugadas com moléculas de glicose e quimioterápico doxorrubicina foram desenvolvidas para avaliar a citotoxicidade dos nanocarreadores e observar sua interação com os transportadores de glicose

(Gluts) em células murinas de carcinoma mamário 4T1 e células normais de fibroblastos embrionários (MEFs) (10). Os resultados apresentados demonstraram que as nanopartículas direcionadas aos Gluts foram endocitadas em maior quantidade pelas células tumorais, aumentando a ação do quimioterápico e com pouca toxicidade dos nanocarreadores nas células normais. Resultados semelhantes foram encontrados com nanopartículas de sílica conjugadas com fármaco celastrol em células de câncer de colo de útero (HeLa), carcinoma de pulmão (A549) e células normais de fibroblastos embrionários (MEFs) (11). Esses estudos demonstraram que a presença de glicose na nanopartícula aumentou sua captação pelas células tumorais (HeLa e A549), sem afetar sobremaneira as células normais representadas por uma linhagem de fibroblastos.

No sistema nervoso central, os transportadores de glicose (GLUTs) estão presentes em grandes quantidades, a fim de garantir suprimento energético as células com maior atividade metabólica do organismo (12). O revestimento de nanopartículas de ouro com moléculas de glicose favorece os nanocarreadores a atravessarem as células endoteliais, da barreira hematoencefálica, através de receptores gluts (13). Gromnicova R. et al (14) estudaram, *in vivo*, a cinética das nanopartículas de ouro conjugadas com glicose nas células do sistema nervoso central. Os resultados demonstraram a presença das nanopartículas no citosol de células endotelial, neurônios e células da glia, indicando potencial uso terapêutico das nanopartículas no tratamento de doenças do sistema nervoso central.

Não encontramos, entretanto, estudos demonstrando a interação de nanopartículas revestidas com glicose com células de câncer prostático, o tipo de tumor com a maior incidência, tanto na população brasileira quanto na mundial ((Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil), com 13.772 mortes no Brasil em 2013 e estimativa de 61.200 novos casos em 2016. As estatísticas apresentadas pela Organização Mundial da Saúde classifica a câncer de próstata como o quarto câncer de maior incidência em todo o mundo (o segundo mais frequente entre os homens), com 307.000 mortes em 2012 e registros de 1,1 milhões de novos casos em todo o mundo (15). Assim, como receptores de glicose foram identificados em várias linhagens de células de câncer prostático, este estudo foi desenvolvido para testar a viabilidade uso da glicose para revestir nanotubos de carbono incorporados com paclitaxel, para endereçá-los às células LNCaP. Outro aspecto a ser considerado é que, embora se tenha demonstrado a ausência de toxicidade de nanopartículas revestidas com glicose sobre fibroblastos, essas células possuem baixa capacidade de endocitose e, por representarem tecido de reparo tecidual, não nos parecem alvos adequados para investigar a inocuidade das preparações. Assim, consideramos que células fagocíticas, por serem as primeiras a interagir com nanopartículas

eventualmente inoculadas in vivo e, por participarem do combate às células tumorais, são alvos mais relevantes para investigar a toxicidade das preparações.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve a finalidade de avaliar a viabilidade de uso da glicose para o endereçamento de nanotubos de carbono carregados com a droga antitumoral paclitaxel para as células de câncer prostático humano, bem como seu potencial tóxico para as células imunocompetentes. Assim, este trabalho visou:

- a) Sintetizar nanotubos de carbono de paredes múltiplas com paclitaxel e revesti-los com glicose;
- b) Verificar a afinidade das células de câncer prostático pelos nanocarreadores modificados com glicose e sua suscetibilidade ao quimioterápico;
- c) Avaliar os efeitos das preparações de nanotubos de carbono em células imunocompetentes.

3. METODOLOGIA

3.1 Oxidação dos nanotubos de carbono.

Para preparar a suspensão aquosa de nanotubos, cinco miligramas de nanotubos de paredes múltiplas (CNT), com dimensões de 6-9 nm de diâmetro e 5 µm de comprimento, foram sonicadas num sonificador Branson (modelo 1510), durante 24 horas em uma mistura de H₂SO₄ e 70% de HNO₃, na proporção de 3:1 (16). A suspensão foi esfriada e mantida em repouso por 4h para permitir a precipitação dos nanotubos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado extensivamente com água deionizada por centrifugação até que o pH da solução se tornasse neutro (pH 7,0). O precipitado foi, em seguida, liofilizado para posterior uso dos nanotubos de carbono oxidados para a imobilização do paclitaxel (PTX) e glicose.

3.2 Modificação dos CNT com polietilenimina (PEI).

Para aumentar sua polidispersividade em soluções aquosas e permitir a incorporação de quimioterápicos, fluorocromos e glicose, os CNT foram sintetizados com polietilenimina (PEI). A fim de ativar as hidroxilas dos CNT, cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 0,6 g) e N-hidroxissuccinimida (NHS, 0,6 g) foram acrescentados a uma suspensão de nanotubos (10 mg) em metanol (50 mL). A mistura foi agitada suavemente à temperatura ambiente durante 3 h, em seguida, PEI (0,6 g) foi adicionado à solução de CNT ativada, seguido por mais 24 h de agitação (17).

Para a síntese de CNT-GLI, foi preparada uma solução de PEI-GLI (18), com 100 mg de PEI e 200 mg de glicose, dispersos em 7 mL de água deionizada durante 2h a 80°C e realizados os mesmos procedimentos de conjugação com CNT como descritos acima. Os CNT incorporados com o polímero foram separados por centrifugação, sendo lavados com água deionizada várias vezes para remover o excesso de polímero, e seguindo-se secagem à vácuo.

3.3 Marcação do CNT-PEI com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células.

Para marcação fluorescente os CNT (0,2 mg) foram dispersos em 1 mL de PBS adicionando-se, em seguida, 1 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC). A mistura foi agitada no escuro à temperatura ambiente durante 24h (2). CNT-FITC foram recuperados por centrifugação e lavados com PBS diversas vezes e a suspensão final foi preparada com PBS.

Esses nanotubos fluoromarcados foram usados apenas para verificar a incorporação dos CNT por células mononucleares (monócitos) e células de câncer prostático (LNCaP).

3.4 Incorporação de CNT por células de câncer prostático e células mononucleares.

As células foram expostas a uma solução de 1 µg/ml de CNT-FITC durante 48h. Os monócitos foram identificados com anticorpos anti-CD14 marcados com APC, enquanto sua incorporação foi avaliada pela positividade em FITC. Os resultados adquiridos em citômetro de fluxo modelo FACS Canto II foram analisados utilizando o software FlowJo, versão vX. 10.6.

3.5 Incorporação de paclitaxel aos CNT.

A incorporação de paclitaxel (PTX) aos CNT (CNT-PTX e CNT-GLI-PTX) foi preparada misturando 3 ml da suspensão de CNT a 0,1 mg/ml com 100 µl de PTX a 1 mg/ml (1,17 mM) dissolvida em PBS e submetida a agitação por 14h à temperatura ambiente (19). A solução foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 min e lavada com água deionizada várias vezes. Após a remoção do PTX não conjugado, o complexo CNT-PTX foi ressuspensão em 1 ml de PBS sob sonicação suave por 30 min. a 40 kHz.

Para estimar a quantidade de PTX conjugado com CNT foi realizada espectroscopia UV/visível das amostras de CNT e PTX em um espectrofotômetro (Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000).

3.6 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

FTIR foi uma das técnicas utilizada na caracterização dos materiais, permitindo a identificação de grupamentos funcionais na superfície. Esta técnica fundamenta-se nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região do IR médio e número de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹. Especificamente para nanotubos de carbono, as bandas relacionadas aos grupos que contenham carbono, oxigênio e hidrogênio destacam-se na análise do espectro deste material, podendo-se verificar a efetividade de tratamentos químicos, como por exemplo, a funcionalização das paredes dos nanotubos. A análise foi realizada em um equipamento modelo Nicolet spectrometer, Nexus 670, disponibilizado por um de nossos colaboradores.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

Os nanotubos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), para medida da densidade, dimensões externas e averiguar a presença de materiais adsorvidos ou incorporados a superfície da nanopartícula. Para efetuar a análise das nanopartículas, as

suspensões de CNT foram depositadas por “dropcoating” em grades de cobre e observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI TecnaiSpirit (FEI Company).

3.8 Cultura de células tumorais.

As células das linhagens de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) foram expandidas e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, 25 mM HEPES, 200 μ M L-glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico (meio completo), para posterior uso experimental. As células foram desgrudadas da superfície das garrafas com uso de tripsina 0,05 % e lavadas em meio completo, seguindo-se o preparo de uma suspensão 1×10^5 cel/ml. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram distribuídas em placas de cultura de poliestireno de 12 poços e incubadas por 48h a 37°C sob tensão de 5% de CO₂.

3.9 Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo.

A atividade citotóxica foi confirmada por citometria de fluxo, utilizando-se a concentração de 1 μ g de CNT (todos os nanotubos foram conjugado com PEI) e 10 nM de PTX para cada 1×10^5 células. Para isso cultura de células tumorais foram cultivadas em placas de 12 poços e submetida aos diferentes tratamentos.

Após 48h de incubação, o conteúdo dos poços (partículas em suspensão, bem como restos celulares) foi removido por lavagem delicada dos alvéolos com meio de cultura à 37°C. Cerca de 1×10^5 células foram recolhidas em eppendorfs e centrifugadas a 10000 rpm por 30 seg. e ressuspensas em isotom (PBS, contendo 0,5 % de BSA) e incubadas por 20 min. a temperatura ambiente com Anexina V. Decorrido o tempo de incubação, as células foram recolhidas em tubos de citometria e marcadas com 7-Amino Actinomicina D (7AAD) para sua aquisição no citômetro de fluxo.

Os grupos de trabalho para esse experimento foram: a) CNT (conjugado com PEI); b) CNT carregado com PTX (CNT-PTX); c) CNT conjugado com glicose (CNT-GLI); d) CNT conjugado com glicose e paclitaxel (CNT-GLI-PTX) e e) apenas PTX em concentração equivalente.

3.10 Cultura de monócitos humanos.

Sangue periférico de doadores saudáveis (n=5) foi colhido em presença de heparina (anticoagulante) e as células mononucleares foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Isopaque, por centrifugação a 1600 rpm por 35 min. A suspensão celular obtida foi então

centrifugada em gradiente de Percoll 51%, e as células do anel formado (rico em monócitos) foram distribuídas em lamínulas redondas estéreis, pré-tratadas com poli-L-lisina. Essas amostras foram avaliadas quanto à capacidade de interação com as diferentes preparações de CNT. As células presentes no precipitado do gradiente de percoll, rico em linfócitos, foram também lavadas e analisadas quanto à capacidade de interiorizar os CNT.

3.11 Diferenciação *in vitro* de células dendríticas.

Células dendríticas (DC) foram geradas a partir de cultura de monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis. Os monócitos cultivados em meio RPMI completo, foram suplementados com 80 ng/ml de (rh) IL-4 e (rh) GM-CSF. Após 6 dias de cultivo, as células frouxamente aderidas foram recolhidas com auxílio de uma pipeta, lavadas com meio completo e a concentração celular foi ajustada para 2×10^5 por poço. As DC foram incubadas na presença de CNT associada a concentração escolhida de PTX para avaliação da viabilidade celular. As células foram também usadas para fenotipagem e ensaios funcionais.

3.12 Fenotipagem de monócitos e DC expostas aos CNT.

A expressão de moléculas na superfície das células expostas às preparações de CNT foi analisada por citometria de fluxo. Cerca de 1×10^5 monócitos ou células dendríticas foram recolhidos em eppendorfs e centrifugadas a 10000 rpm por 30 seg. e ressuspensas em isoton. Anticorpos específicos para marcadores de interesse foram adicionados em concentrações apropriadas e incubados por 20 min. a 4°C, ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com isoton e recolhidas em tubos de citometria para sua aquisição no citômetro de fluxo.

As moléculas analisadas foram: CD14 e CD11c utilizadas como marcadores das populações de monócitos e DCs respectivamente; CD86 e CD80 (moléculas de co-estimulação); HLA-DR (molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe II); CD83 (expressão aumentada em mDCs); PD-L1 (molécula de supressão); CD64 (marcadores de macrófagos) e 7AAD. Os fluorocromos utilizados em cada anticorpo estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1: Moléculas analisadas na superfície de monócitos e células dendríticas com seus respectivos marcadores.

Monócitos	Células Dendríticas (DCs)	Marcador
CD86	CD86	FITC
HLADR	HLADR	PE
CD80	CD80	APC-H7
CD83	CD83	PeCy7
PD-L1	-----	PE
CD64	-----	Alexa 488
CD14	CD11c	APC
7AAD	7AAD	PercP

FITC = Isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; PeCy7 = ficoeritrina-cianine tandem 7; APC = alofococianina; APC-H7 = alofococianina-cyanine tandem 7; Alexa 488 = Alexafluor 488; PercP = clorofila peridinina.

3.13 Reação mista de linfócitos (MLR).

Os efeitos gerados pelos tratamentos das nanopartículas nas DCs foram analisados por Reação Mista de Linfócitos (MLR) para averiguar sua influência na capacidade de induzir a proliferação de células T.

Cerca de $1,25 \times 10^6$ células foram plaqueadas por poço e no 5º dia as DCs foram tratadas com as preparações de CNTs e PTX previamente descritos. O grupo controle positivo (Controle⁺) foi tratada com coquetel de ativação composto por IL-1, IL-6, TNF e PGE2. No 7º dia foi realizada a sua fenotipagem e sua incubação com os linfócitos. As moléculas avaliadas na fenotipagem foram CD86, HLA-DR e CD80.

Linfócitos alogênicos totais foram marcados com CFSE (20) através da incubação dos linfócitos em PBS-BDA 0,5% contendo 10 μ M de CFSE, a 37° C, no escuro, por 10 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas 3 vezes, por 7 minutos, a 800g em meio completo. Em todos os experimentos de resposta alogênica foi utilizada a proporção de 1:10 entre DCs e linfócitos. A co-cultura foi mantida por 5 dias e no final deste período os linfócitos foram marcados para moléculas CD3, CD4 e CD8 e verificada sua proliferação.

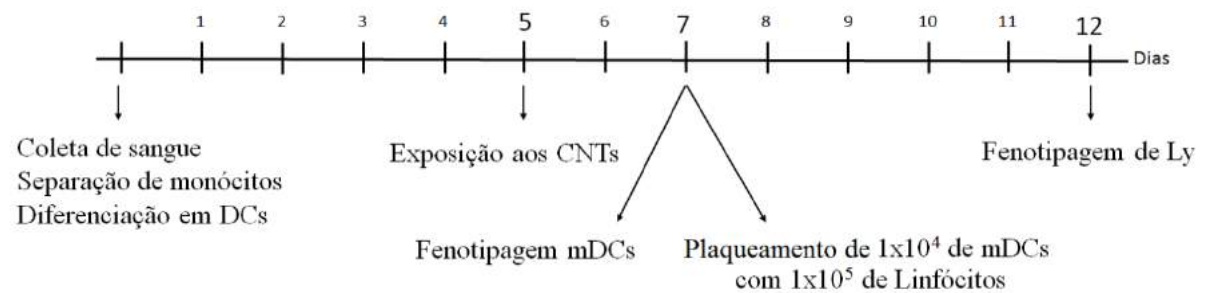


Figura 1 - Cronograma de um ensaio de Reação Mista de Linfócitos (MLR). Depois de colher sangue e dar estímulo para os monócitos se diferenciarem em DCs, as células foram expostas aos CNTs no 5º dia, no 7º dia as DCs foram fenotipadas e incubadas com linfócitos e observado seu perfil de proliferação no 12º dias.

3.14 Análise estatística.

Os ensaios que envolveram células de sangue periférico foram realizados com material biológico de 5 doadores saudáveis. Os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey-Kramer, considerando significativas as diferenças com probabilidade de erro menor ou igual 5% ($\alpha \leq 0,05$). Todos os ensaios funcionais foram repetidos pelo menos 3 vezes.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das nanopartículas por FTIR.

FTIR é uma técnica fundamentada nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região do infravermelho médio e número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} . Especificamente para nanotubos de carbono, as bandas relacionadas aos grupos que contenham carbono, oxigênio e hidrogênio destacam-se na análise do espectro deste material, podendo-se verificar a efetividade de tratamentos químicos, como por exemplo, a funcionalização de suas paredes (Figura 2).

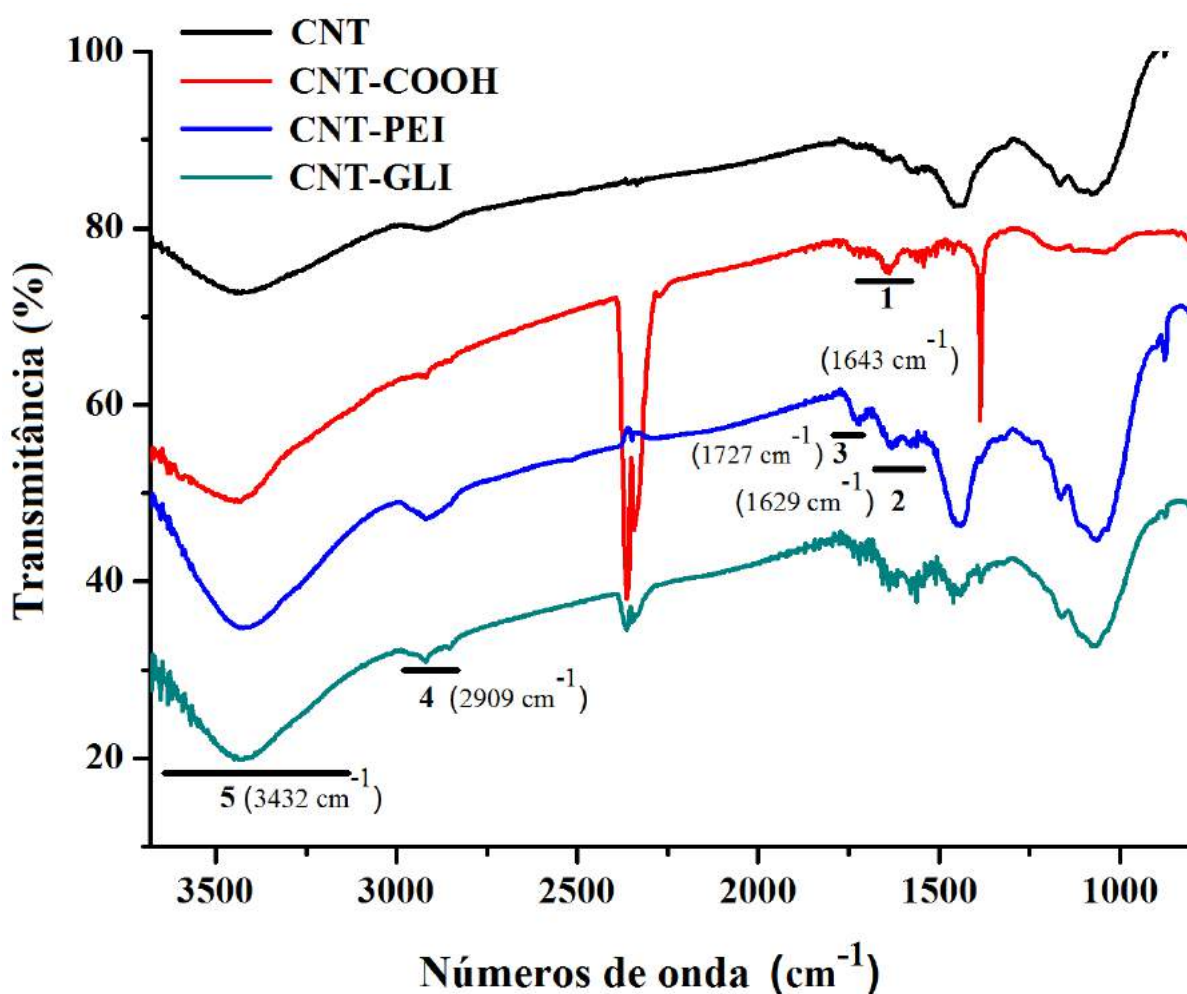


Figura 2—Caracterização dos nanotubos de carbono por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises dos espectros de FTIR das amostras de CNT puro, CNT hidroxilado (CNT-COOH), CNT conjugado com polímero (CNT-PEI) e CNT conjugado com polímero e glicose (CNT-GLI), indicaram os principais componentes das nanopartículas depois de submetidas aos tratamentos com ácido sulfúrico/ácido nítrico e incorporação de polímeros. A incorporação do polímero polietilenimina (PEI) nas nanopartículas (CNT-PEI e CNT-GLI) é observada pela presença de vibrações moleculares, características, de grupos aminas (regiões 2-5).

Como detalhado na tabela 2, as regiões correspondentes aos picos 1 e 3 representam estiramentos C=O existentes nas nanopartículas. Como consequência da incorporação do polímero as vibrações moleculares da região 1 passaram a ser representadas na região 3. A presença de deformação angular N-H e ligações CH₂-NH₂(também presentes na região do pico 4) no espectro de CNT-PEI contribui para comprovar a incorporação do polímero nas nanopartículas. A região do pico 5 corresponde a estiramentos O-H das nanopartículas e sua maior intensidade no espectro de CNT-PEI pode ser correspondente à presença de ligações N-H e de aminas secundárias. As principais regiões destacadas no espectro CNT-PEI também podem ser observadas no espectro CNT-GLI, assegurando a presença do polímero em ambas as amostras de CNT.

Tabela 2: Principais componentes das vibrações moleculares detectadas por FTIR nas amostras de CNTs.

REGIÕES	COMPONENTES
1	Estiramento C=O (1643 cm ⁻¹) (21-23).
2	Aminas primárias (CH ₂ – NH ₂), Deformação angular NH (1629 cm ⁻¹) (17, 21).
3	Estiramento C=O (1727 cm ⁻¹) (21-23).
4	C-H; CH ₂ - NH ₂ (18, 24).
5	Estiramento O-H; Estiramento N-H; Aminas Secundárias (CH ₂ - NH - CH ₂) e NH ₂ (18).

4.2 Alteração morfológica dos CNT induzida pela incorporação de materiais.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada para análise da morfologia dos CNTs após a incorporação dos diferentes materiais. Na Figura 3 demonstramos o perfil dos CNTs por TEM e as modificações de suas paredes depois da síntese com polímero. A sequência da Figura 3A demonstra CNT puros em 2 diferentes aumentos. A sequência 3B mostra os CNT após incorporação do PEI, sugerindo aumento da densidade das partículas. A sequência 3C, mostra os CNT incorporados com PEI e glicose (PEI-GLI), seguindo aumento de diâmetro das paredes dos nanotubos e melhor distribuição do polímero sobre as nanopartículas.

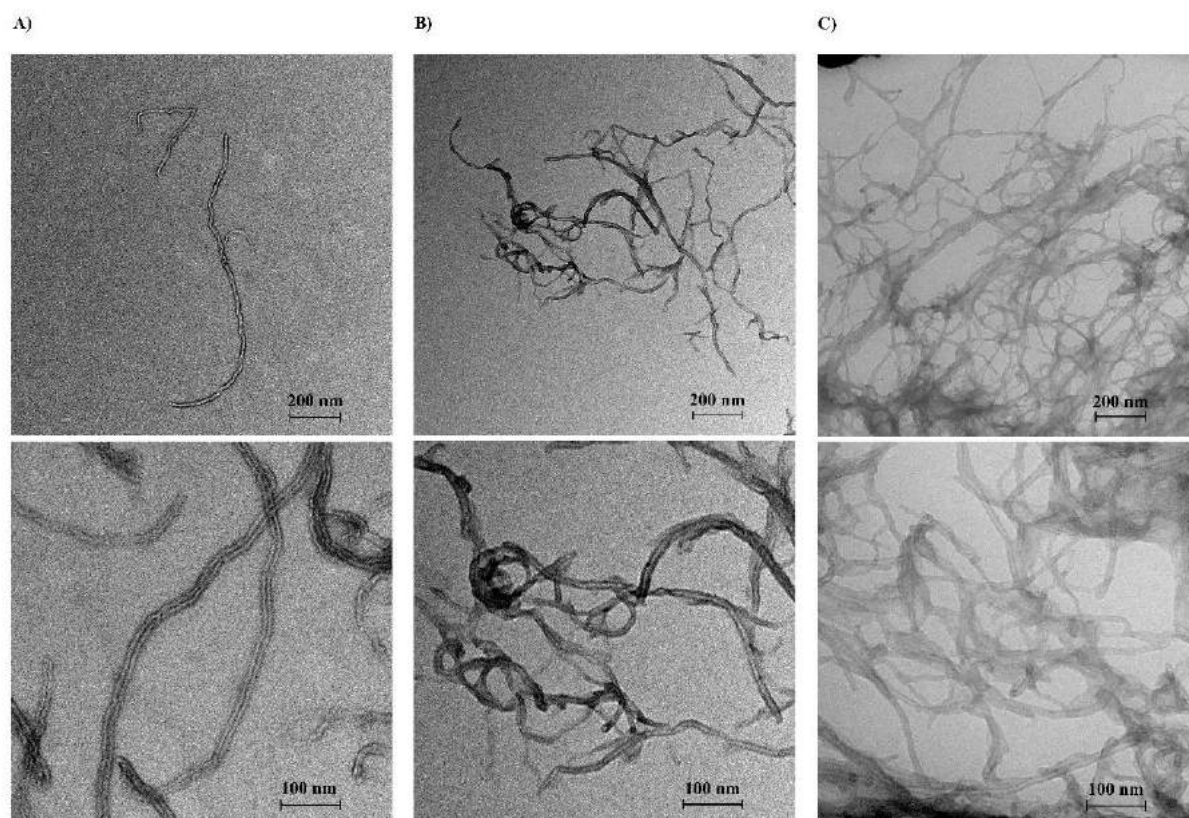


Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de (A) CNT puro, (B) CNT conjugados com PEI e (C) CNT conjugado com PEI-GLI em dois diferentes aumentos.

4.3 Nanotubos de carbono interagem com células de câncer prostático e com monócitos de sangue periférico.

Para investigar a interação dos CNT com células de câncer prostático e células imunocompetentes, adicionamos nanotubos previamente marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esse fluorocromo emite luz verde quando excitado por U.V. em laser no comprimento de onda de 488 nm, podendo ser detectado por citometria de fluxo. Este ensaio foi realizado com CNT-PEI e CNT-GLI marcados com FITC (CNT-FITC e CNT-GLI-FITC) pois foi delineado apenas para evidenciar a interação das nanopartículas com as células.

A análise por citometria de fluxo comprova a interação das nanopartículas com as células LNCaP (Figuras 4A e 4B), com mais de 60% da população de células tumorais exibindo a marcação com FITC.

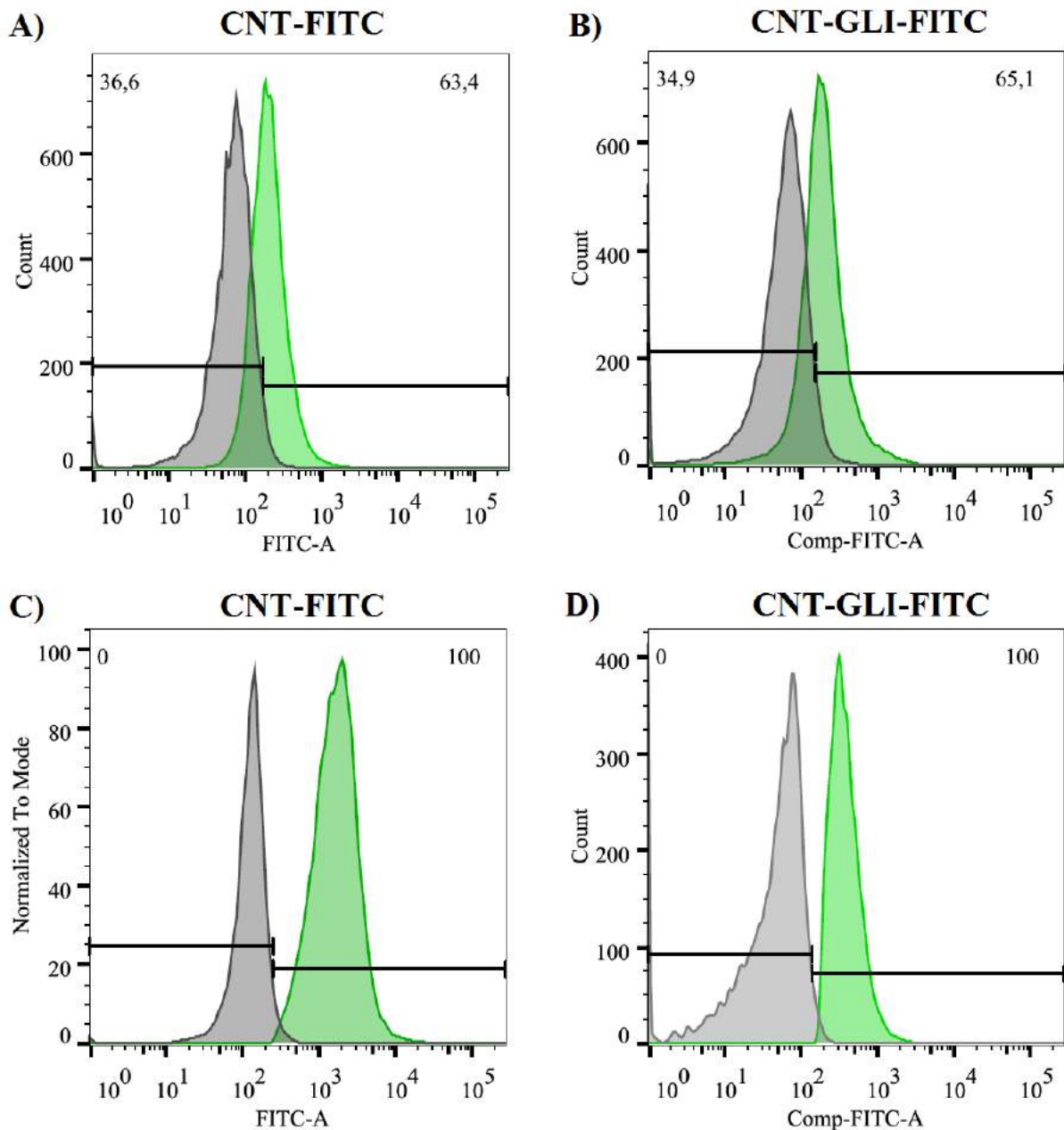


Figura 4 - Incorporação de CNT-FITC e CNT-GLI-FITC em células de câncer prostático e monócitos. Histogramas demonstrando a porcentagem de células de câncer prostático FITC⁺ depois de incubas por 48h com CNT-FITC (A) e CNT-GLI-FITC (B), nos quais o histograma em verde representa as células FITC⁺ e o histograma em cinza representa a população de células não marcada. Histogramas demonstrando a porcentagem de monócitos FITC⁺ depois de incubas por 48h com CNT-FITC (C) e CNT-GLI-FITC (D).

Um ponto fundamental no estudo com nanopartículas com potencial de uso terapêutico é a possibilidade de que sejam muito rapidamente fagocitadas por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, limitando a eficiência terapêutica. Assim, avaliamos também a interação dos CNTsfluoreceinados com monócitos de doadores saudáveis, efetuando a análise por citometria de fluxo. Os resultados representados na Figura 4C e 4D demonstram a

capacidade das células de sangue periférico em fagocitar grandes quantidades de partículas fluoromarcadas.

4.4 Citotoxicidade dos CNT-PTX e CNT-GLI-PTX em células tumorais LNCaP, monócitos e células dendríticas.

Utilizado para determinar quantitativamente a porcentagem de células que sofreram apoptose, a anexina V é um composto que apresenta afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido exposto na face externa da membrana celular quando a célula se encontra em processo de apoptose. Pelo fato da translocação da fosfatidilserina também ocorrer durante a necrose, utilizamos paralelamente a marcação com 7AAD, que penetra nas células que perderam a integridade da membrana celular.

A presença de glicose nas partículas carregadas com PTX (grupo CNT-GLI-PTX) teve efeito citotóxico ligeiramente superior ($7AAD^+/Anexina\ V^+ = 23,0$) quando comparada com PTX puro ($7AAD^+/Anexina\ V^+ = 19,9$) e CNT-PTX ($7AAD^+/Anexina\ V^+ = 19,9$) (Figura 5), indicando que a glicose favorece a interação das partículas com as células tumorais. Quando comparamos a viabilidade celular do grupo controle com os grupos que foram expostos às nanopartículas não conjugadas com PTX, observamos baixa toxicidade de CNT-PEI e CNT-GLI.

A captura de CNT-PTX e CNT-GLI-PTX por monócitos humanos e células dendríticas não afetam a viabilidade celular, com índices de necrose (Figura 5G 5F) abaixo ou igual ao grupos tratadas com PTX puro.

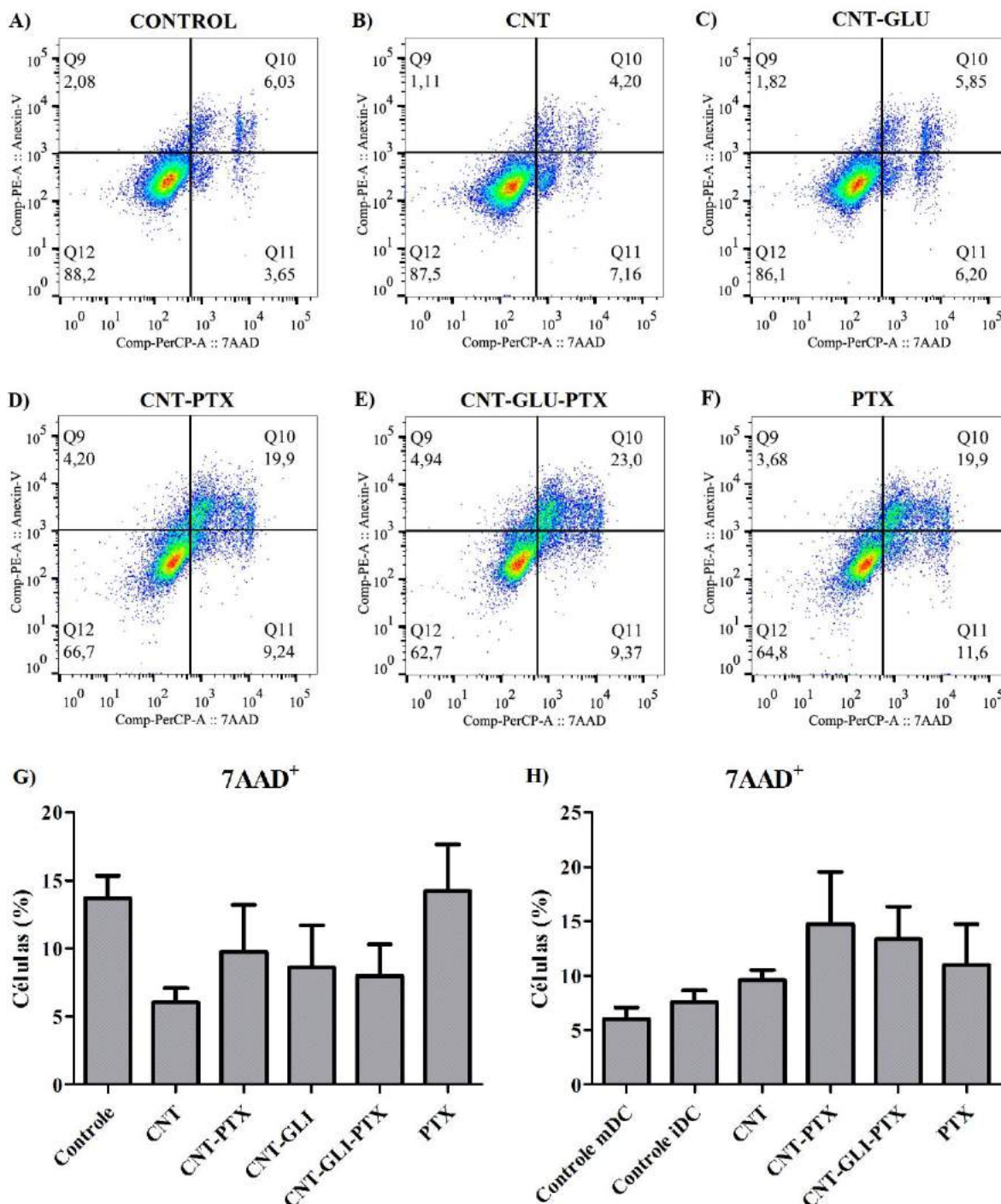


Figura 5 - Análise de apoptose (anexina-V⁺ nos quadrantes superiores direito e esquerdo) e necrose, pela marcação com e 7AAD⁺ (nos quadrantes superior e inferior direitos) das células de câncer prostático (LNCaP) depois de submetidas a 48h aos seguintes tratamentos: Controle (nenhum tratamento) (A); CNT (B); CNT-GLI (C); CNT-PTX (D); CNT-GLI-PTX (E) e PTX (F). Os dados apresentados nas Figuras 5G e 5H representam, respectivamente, as porcentagens de monócitos (n=5) e células dendríticas nos (n=3) 7AAD⁺. Demonstrando a citotoxicidade dos CNTs, depois de expostas por 48h aos tratamentos com CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX.

4.5 Efeito dos CNT sobre o fenótipo dos monócitos de doadores saudáveis.

Visto que os nanotubos foram intensamente fagocitados pelos monócitos, perguntamos se tal fenômeno teria repercussão nas características fenotípicas e funcionais de células do sistema imune. Nesse sentido, nosso passo seguinte foi avaliar se a exposição de monócitos humanos às diferentes preparações de nanotubos seria capaz de modificar a expressão de marcadores de superfície participantes da apresentação de antígenos dessas células.

A Figura 6 ilustra a estratégia de seleção e análise das populações estudadas, partindo dos “singlets” (Figura 6A), seleção da população por tamanho e granulosidade características de monócitos (Figura 6B), exclusão de células mortas 7AAD⁺ (Figura 6C) e seleção de células CD14⁺ dentro da população de células vivas (Figura 6D).

A análise dos dados indica que um grande número de monócitos expostos as diferentes preparações de CNT passaram a expressar as moléculas PD-L1, enquanto o PTX puro não apresentou o mesmo efeito (Figura 6G). O nanotubos sintetizados com PTX (CNT-PTX) apresentaram uma redução na expressão de HLA-DR enquanto os demais tratamentos apresentaram o mesmo perfil de expressão (Figura 6F).

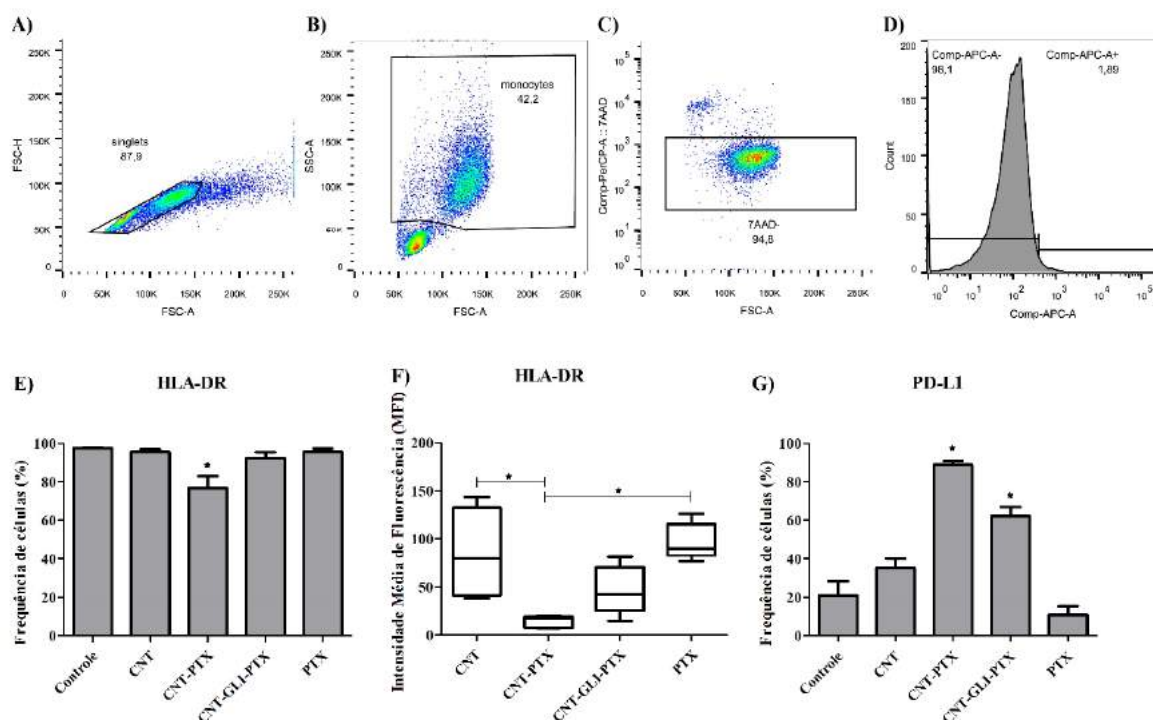


Figura 6 - Estratégia de gating nas análises de monócitos e células dendríticas (DCs): A) gatesinglets representando eventos que passaram individualmente pelo laser; B) gate na população de interesse, baseado em tamanho e granulosidade das células; C) gate feito nos eventos 7AAD⁻ para exclusão das células mortas; D) gate feito dentro da população CD14⁺ para os monócito. Observamos a porcentagem de células que expressam HLA-DR (E),e sua respectiva intensidades médias de fluorescências (MFI) (F),e PD-L1 (G). Os grupos experimentais foram compostos por CNT, CNT-PTX, CNT-GLI, CNT-GLI-PTX e PTX.

4.6 Preparação de CNT não afetam o fenótipo de linfócitos e de células dendríticas.

Como pode ser observado na Figura 7 a exposição de linfócitos às diferentes proporções de CNT não promoveu alterações na expressão de CD19⁺, PD-1⁺ e CD25⁺ por linfócitos T totais (CD3⁺) indicando que os nanotubos, independentemente da forma de preparação das partículas, não interfere no fenótipo dessas células.

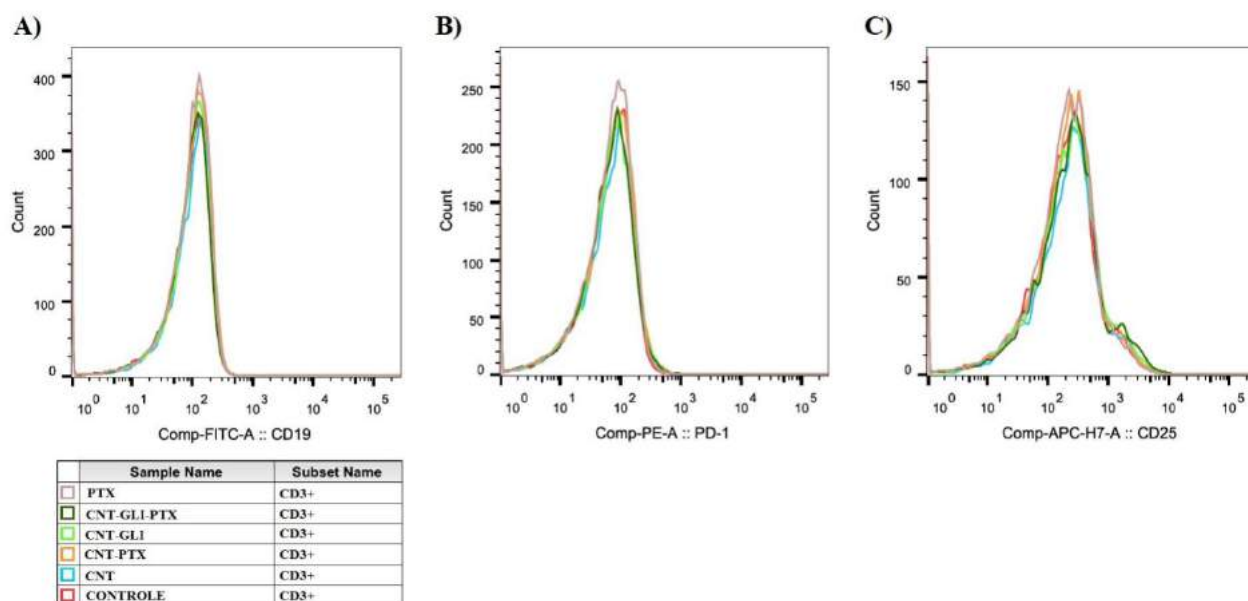


Figura 7 - Histogramas demonstrando a expressão de CD19 (A), PD-1 (B) e CD25 (C) na superfície de linfócitos expostos a CNT, CNT-PTX, CNT-GLI, CNT-GLI-PTX e PTX.

Nas células dendríticas, nossos resultados demonstram que os CNT não promovem alterações relevantes no número de células HLA-DR⁺, CD80⁺ ou CD86⁺ (Figuras 8A, 8B e 8C), porém as nanopartículas carregadas com PTX aumentaram a intensidade de fluorescência (MFI) de CD86 e HLA-DR (Figuras 8D e 8E) nas células.

Os grupos intitulados Controle⁺ e Controle⁻ são compostos, respectivamente, por DCs maduras (mDCs) ativadas pelo coquetel de ativação e DCs imaturas (iDCs) que não receberam nenhum estímulo.

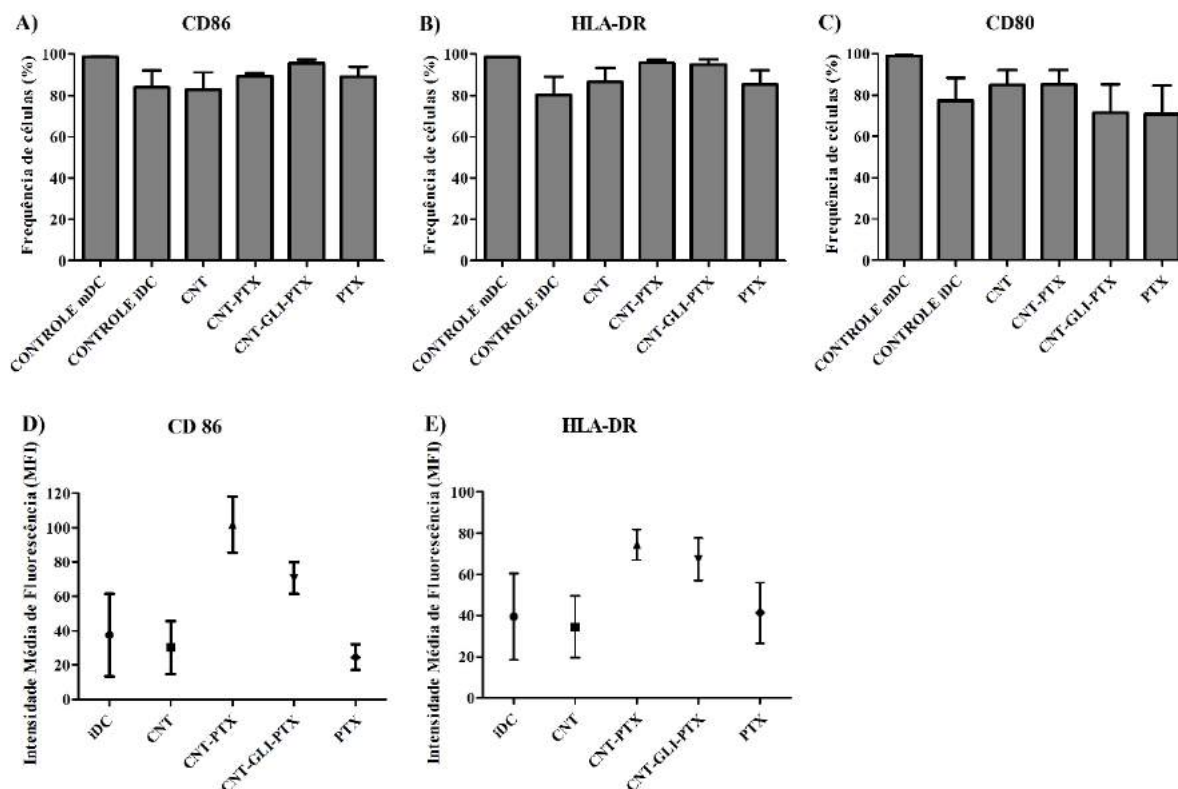


Figura 8 - Fenótipo de DCs depois de submetidos a diferentes tratamentos. Foi observada a porcentagem de células que expressão CD86⁺ (A), HLA-DR⁺ (B) e CD80⁺ (C) e suas respectivas intensidades médias de fluorescências (MFI) (D e E). O grupo Controle mDC representa DCs que foram tratadas com coquetel de ativação para se diferenciarem em DCs maduras (mDC) e o Controle iDC representa as DCs que não receberam nenhum tratamento.

4.7 CNT-GLI-PTX reduz a capacidade de estimulação alogênicas DC.

A função mais importante atribuída às DCs é o processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos T. Assim, as DC capturam antígenos, promovem seu processamento e expressam fragmentos antigênicos (peptídeos) associados às moléculas de histocompatibilidade para os linfócitos. Uma característica inerente aos linfócitos é sua capacidade de reconhecer diretamente os aloantígenos (moléculas de histocompatibilidade), de modo mais intenso que aos peptídeos associados a tais moléculas. Esse fenômeno pode ser observado em um modelo de avaliação *in vitro* denominado reação mista de leucócitos (MLR) no qual linfócitos de um indivíduo são cocultivados com as DC de outro, cujas moléculas de histocompatibilidade são diferentes. Assim os linfócitos reconhecem os aloantígenos das DC e são estimulados, pelos últimos, a proliferar. Essa capacidade de apresentar o aloantígeno e induzir resposta proliferativa é uma representação clássica do papel de apresentação de antígenos das DC.

No presente estudo, as DC imaturas (iDC) foram cultivadas com as preparações de nanotubos e após 48h foram recuperadas para posterior co-cultivo com linfócitos T alogênicos.

Na Figura 9 estão representados os *gates* de análise (9A e 9B) e os perfis de proliferação das células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ (Figuras 9C, 9D e 9E). A Figura 9F e a Figura 10 demonstram as médias de três experimentos de MLR, indicando que a exposição de DC ao PTX, bem como ao CNT-GLI-PTX prejudica a capacidade de indução de resposta alogênica por parte dos linfócitos.

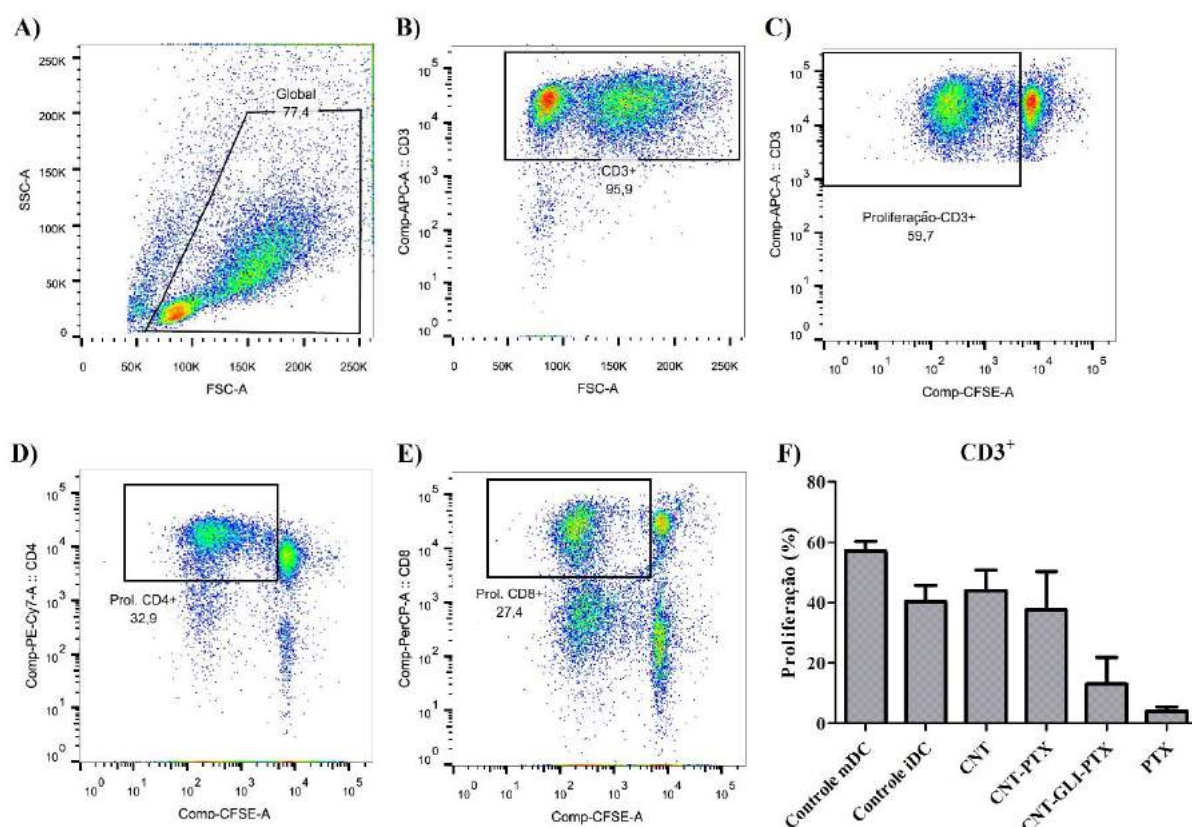


Figura 9 - Linfócitos totais marcados com CFSE foram estimulados por 5 dias pelas DCs, previamente tratadas com os CNTs, a fim de averiguar sua capacidade de induzir a proliferação de células T. A análise foi baseada em estratégia de *gating* selecionando as células por: A) tamanho e granulosidade; B) eventos $CD3^+$; C) proliferação eventos $CD3^+$; D) proliferação eventos $CD3^+/CD4^+$; E) proliferação eventos $CD3^+/CD8^+$. A proliferação dos linfócitos T totais, incubados com DCs previamente submetidas a tratamentos com CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX, foram quantificadas em porcentagem de células $CD3^+$ (F). (n=3).

A figura 10 indica que tanto os linfócitos T CD4⁺, quanto os CD8⁺ tiveram sua proliferação igualmente afetada,

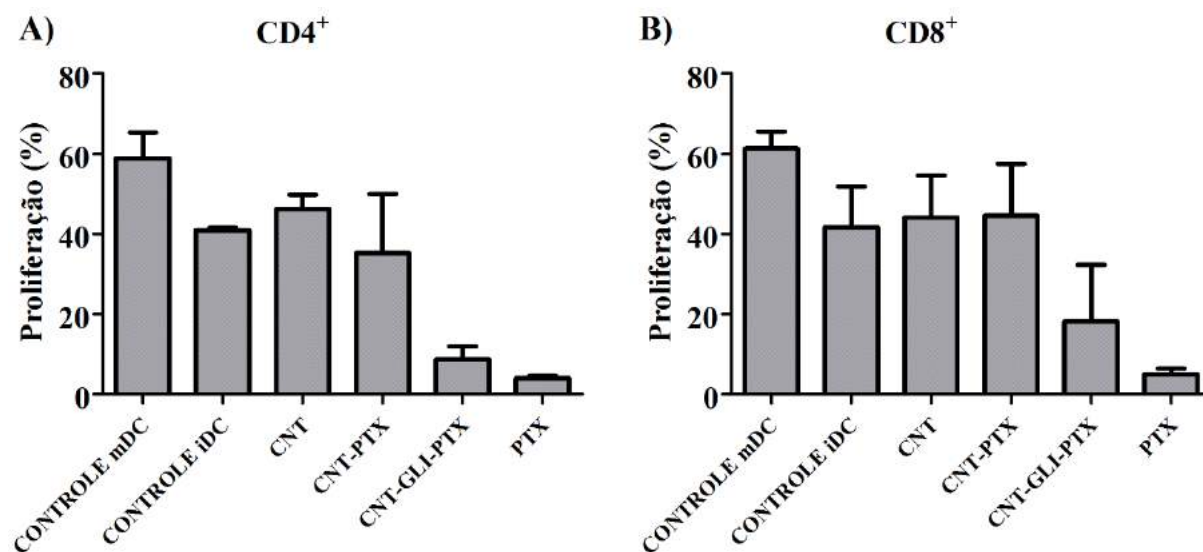


Figura 10—Análise de proliferação de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺/CD4⁺) (A) e linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺/CD8⁺) (B) por citometria de fluxo. Os linfócitos foram co-cultivados, durante 5 dias, com células dendríticas (DCs) previamente tratadas com coquetel de ativação (Controle mDC), sem tratamento (Controle iDC), CNT, CNT-PTX, CNT-GLI-PTX e PTX. (n=3)

5. DISCUSSÃO

A captura de nanocarreadores por células fagocíticas é uma das principais barreiras para melhorar a eficácia terapêutica de nanotubos de carbono. Uma vez que a alta atividade metabólica das células tumorais poderia favorecer sua ligação com moléculas de glicose, decidimos revestir os CNTs com o açúcar, como tentativa de endereçamento dos nanotubos para essas células. No presente estudo investigamos o transporte de paclitaxel por nanotubos de carbono, testamos sua efetividade a células de câncer prostático após a incorporação de moléculas de glicose e seus efeitos nas células imunocompetentes.

Para garantir a presença de grande quantidade de moléculas de glicose na superfície da nanopartícula, optamos por elaborar uma solução de polietilenimina (PEI) complexada com o açúcar na cadeia polimérica (PEI-GLI) e depois continuar normalmente os procedimentos de incorporação do polímero na nanopartícula. O revestimento dos CNT com polímero contribui para aumentar sua dispersividade em soluções aquosas, ajudando a evitar grandes aglomerações de partículas e possibilitando a conjugação de outras substâncias nas suas paredes (25, 26).

Assim, a síntese destes nanocarreadores com polietilenimina e o agente antitumoral paclitaxel foi seguida por caracterizações físicas que demonstraram alterações na sequência de incorporação dos diferentes materiais. Inicialmente, analisamos o espectro de CNT-PEI produzido por FTIR para evidenciar a incorporação do polímero nos CNTs. Esta técnica permite a visualização de regiões que destacam devido às vibrações moleculares das ligações químicas presentes nas nanopartículas. Especificamente pudemos observar as regiões de números de onda 1629, 2909 e 3432 cm^{-1} correspondentes as ligações $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ e $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$ presentes nas aminas primárias e secundárias do polímero (17, 18). As mesmas regiões destacadas no espectro CNT-PEI também são observadas no espectro CNT-GLI, garantindo a incorporação do polímero na nanopartícula mesmo depois de sua modificação com moléculas de glicose.

As alterações provocadas pela incorporação de PEI e PEI-GLI foram também evidenciada pelos resultados das análises por microscopia eletrônica de transmissão, que revelou a presença de múltiplas camadas de grafeno enroladas entre si formando um tubo, com paredes externas aparentemente “lisas”, enquanto a conjugação do PEI foi responsável por mudanças estruturais na superfície dos CNT. Sua distribuição aleatória nas paredes ocasionou aumento de espessura das nanopartículas devido a presença da camada polimérica e a conjugação com moléculas de glicose tornou a distribuição do polímero mais homogênea nos CNT.

A incorporação de FITC na superfície do CNT-GLI permitiu observar um aumento da interação da nanopartícula com as células tumorais LNCaP. Quando comparamos os resultados de CNT-FITC observamos um aumento no número de células FITC⁺ depois de incubadas com nanopartículas complexadas com glicose.

O ensaio de apoptoses/necrose confirmou a baixa toxicidade dos CNT e CNT-GLI nas células LNCaP, enquanto o complexo CNT-PTX apresentou a mesma toxicidade do que PTX puro, induzindo apoptose tardia e morte celular (anexina V⁺/7AAD⁺). A incorporação da glicose (CNT-GLI-PTX) aumentou a toxicidade das nanopartículas, determinando índices mais elevados de morte celular (anexina V⁺/7AAD⁺), o que nos leva a concluir que a glicose melhorou a capacidade dos CNT de transportar o quimioterápico. Assim, nossos resultados sugerem que os CNT-GLI-PTX poderiam ser mais eficazes que PTX puro a médio prazo. Esse achado é compatível com estudos prévios em que as nanopartículas complexadas com PTX apresentaram toxicidade superior ao tratamento com PTX puro sobre as células HeLa, MCF7 e SKOV3, enquanto os CNTs sozinhos não induziram nenhum efeito citotóxico (27, 28).

Nossa tentativa de endereçar os CNT às células tumorais foi bem sucedida, visto que os CNT-GLI-PTX induziram mais apoptose/necrose nas células LNCaP, do que CNT isolado, CNT-PTX ou até PTX puro. Entretanto, o revestimento com glicose não foi suficiente para evitar sua interação com monócitos, visto que tanto CNT-PTX quanto CNT-GLI-PTX interagiram ativamente com essas células e provocaram alterações em seu fenótipo.

Esse é um achado relevante pois é desejável que os nanocarregadores endereçadas às células tumorais não sejam precocemente capturados por células fagocíticas e que, caso isso ocorra, não haja prejuízo para essas células. Nos monócitos, a análise da intensidade mediana de fluorescência (MFI), normalizada pelo MFI do grupo controle, indica que tanto CNT polimerizado quanto PTX puro aumentam a expressão de HLA-DR, enquanto que CNT-GLI afeta apenas ligeiramente a expressão desse marcador. O efeito de PTX na expressão de HLA-DR não é uma surpresa, uma vez que este grupo já observou anteriormente que baixas concentrações de agentes antineoplásicos, como paclitaxel, são capazes de modular de forma positiva a expressão de marcadores de ativação de maturação de células dendríticas (29), aumentando a sua capacidade de desencadear uma resposta anti-tumoral *in vitro* (30, 31). Em contraste, a incorporação de PTX nos CNT (CNT-PTX e CNT-GLI-PTX) diminuiu a expressão de HLA-DR, mas foram capazes de aumentar a expressão de moléculas CD80 nas células. Tanto HLA-DR quanto CD80 estão envolvidos na apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas (31), sendo fundamentais para apresentar peptídeos antigênicos para as células T CD4⁺. Uma vez que o PTX interfere na organização de microtúbulos durante a divisão

celular (32), a diminuição de expressão de HLA-DR pelas células tratadas com CNT-PTX parece ser devido ao efeito das partículas no processamento de antígenos, montagem e apresentação dos peptídeos associados ao MHC, necessárias para a expressão de MHC de classe II na superfície da célula. Por outro lado, a densidade de CD80 na superfície dos monócitos aumentou após o tratamento com CNT-PTX, sugerindo que a expressão dessa molécula co-estimuladora pode não ser dependente de processamento do antígeno. Também foram analisadas o perfil de expressão da molécula de co-estimulação CD86 e o marcador de maturação CD83 e ambos se mantiveram constantes entre todos os grupos experimentais.

Apesar das alterações fenotípicas induzidas pelo CNT-PTX não observamos influência sobre a função das DC, como demonstrado pelo ensaio de reação mista de linfócitos. Resultados similares com DCs foram encontrados por Anna A. Shvedova (33) e Clara Ballerini (34), que examinaram seu fenótipo e sua capacidade estimulatória depois de exposta aos CNT. Os autores demonstraram que a expressão de marcadores de maturação, HLA DR, CD80, CD86, e CD83, não foram alteradas após 48h. Diferente de nossos achados, esses autores observaram que as DCs tratadas com altas doses de CNT apresentaram efeitos supressores sobre células T, sugerindo menor prejuízo funcional com nossa preparação. Visto que as concentrações testadas em nosso estudo não interferiram na capacidade das DCs de induzir a proliferação de linfócitos, nossos resultados reforçam nosso conceito de que baixas doses de PTX podem ser manipuladas com muito mais segurança para se atingir ação antitumoral, pois apresentam menor risco de induzir tolerância. Entretanto a presença de glicose (GLI) parece favorecer a captura das partículas pelas DCs e, nesse caso, reduzindo sua capacidade de estimulação alogênica. É possível que isso se deva ao maior potencial citotóxico das partículas incorporadas com PTX, pois, a análise de células 7AAD⁺ após exposição aos CNT, indicam maior toxicidade da amostra CNT-PTX e CNT-GLI-PTX que os demais CNT (Figura 5H).

6. CONCLUSÃO

Tomando em conjunto, nossos resultados nos levam a concluir que os nanotubos de carbono são eficientes carreadores de paclitaxel para células de câncer prostático, capaz de produzir efeitos citotóxicos semelhantes ou superiores ao quimioterápico puro. A conjugação com moléculas de glicose favorece a internalização das nanopartículas pelas células LNCaP, aumentando a ação do CNT-PTX sobre as células de câncer prostático. Embora altamente fagocitados pelos monócitos e capazes de inibir a expressão de HLA-DR e aumentar a expressão de PD-L1, as nanopartículas não mostraram toxicidade para as células de defesa. Nos linfócitos, as nanopartículas não causaram nenhuma mudança fenotípica, porém CNT-GLI-PTX reduz a capacidade de estimulação alogênicas das DCs, prejudicando a linfoproliferação. Assim, os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para compreender melhor a ação dos CNTs como agente carreador de drogas e seus principais efeitos nas células de câncer prostático e células imunocompetentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hatanaka M. Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1974;355(1):77-104.
2. Hamanaka RB, Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(2):211-5.
3. Rempel A, Mathupala SP, Griffin CA, Hawkins AL, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer research*. 1996;56(11):2468-71.
4. Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. *Annual review of physiology*. 1985;47:503-17.
5. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1835(2):164-9.
6. Xu CF, Liu Y, Shen S, Zhu YH, Wang J. Targeting glucose uptake with siRNA-based nanomedicine for cancer therapy. *Biomaterials*. 2015;51:1-11.
7. Maublant J, Vuillez JP, Talbot JN, Lumbroso J, Muratet JP, Herry JY, et al. [Positron emission tomography (PET) and (F-18)-fluorodeoxyglucose in (FDG) in cancerology]. *Bulletin du cancer*. 1998;85(11):935-50.
8. Dhanikula RS, Argaw A, Bouchard JF, Hildgen P. Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: enhanced efficacy and intratumoral transport capability. *Molecular pharmaceutics*. 2008;5(1):105-16.
9. Shan XH, Wang P, Xiong F, Gu N, Hu H, Qian W, et al. MRI of High-Glucose Metabolism Tumors: a Study in Cells and Mice with 2-DG-Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2016;18(1):24-33.
10. Li J, Ma F-K, Dang Q-F, Liang X-G, Chen X-G. Glucose-conjugated chitosan nanoparticles for targeted drug delivery and their specific interaction with tumor cells. *Frontiers of Materials Science*. 2014;8(4):363-72.
11. Niemelä E, Desai D, Nkizinkiko Y, Eriksson JE, Rosenholm JM. Sugar-decorated mesoporous silica nanoparticles as delivery vehicles for the poorly soluble drug celastrol enables targeted induction of apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;96:11-21.
12. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *European journal of pharmacology*. 2004;490(1-3):13-24.
13. Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, Romero IA, Lund T, Roitt IM, et al. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PloS one*. 2013;8(12):e81043.

14. Gromnicova R, Yilmaz CU, Orhan N, Kaya M, Davies H, Williams P, et al. Localization and mobility of glucose-coated gold nanoparticles within the brain. *Nanomedicine*. 2016;11(6):617-25.
15. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
16. Osorio AG, Silveira ICL, Bueno VL, Bergmann CP. H₂SO₄/HNO₃/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Appl Surf Sci*. 2008;255(5):2485-9.
17. Wu H, Shi H, Zhang H, Wang X, Yang Y, Yu C, et al. Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery. *Biomaterials*. 2014;35(20):5369-80.
18. Zhang X, Zhang X, Yang B, Yang Y, Chen Q, Wei Y. Biocompatible fluorescent organic nanoparticles derived from glucose and polyethylenimine. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2014;123:747-52.
19. Tian Z, Shi Y, Yin M, Shen H, Jia N. Functionalized multiwalled carbon nanotubes-anticancer drug carriers: synthesis, targeting ability and antitumor activity. *Nano Biomedicine & Engineering*. 2011;3(3).
20. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1):147-54.
21. Mantha S, Pedrosa VA, Olsen EV, Davis VA, Simonian AL. Renewable nanocomposite layer-by-layer assembled catalytic interfaces for biosensing applications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2010;26(24):19114-9.
22. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, Cheng HKF, et al. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications*. 2011;47(18):5235-7.
23. Pourfayaz F, Boroun S, Babaei J, Ebrahimi Hoseinzadeh B. An Evaluation of the Adsorption Potential of MWCNTs for Benzene and Toluene Removal. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;10(1):27-34.
24. Mombeshora ET, Simoyi R, Nyamori VO, Ndungu PG. Multiwalled carbon nanotube-titanium nanocomposites: Understanding nano-structural parameters and functionality in dye-sensitized solar cells. *South African Journal of Chemistry*. 2015;68:153-64.
25. Byrne MT, McNamee WP, Gun'ko YK. Chemical functionalization of carbon nanotubes for the mechanical reinforcement of polystyrene composites. *Nanotechnology*. 2008;19(41):415707.

26. Ma P-C, Siddiqui NA, Marom G, Kim J-K. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: a review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2010;41(10):1345-67.
27. Lay CL, Liu HQ, Tan HR, Liu Y. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology*. 2010;21(6):065101.
28. Sobhani Z, Dinarvand R, Atyabi F, Ghahremani M, Adeli M. Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:705-19.
29. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *Journal of immunology*. 2009;183(1):137-44.
30. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(9):1141-51.
31. Shurin GV, Amina N, Shurin MR. Cancer therapy and dendritic cell immunomodulation. *Dendritic Cells in Cancer*: Springer; 2009. p. 201-16.
32. Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 2004;23(11):2016-27.
33. Tkach AV, Shurin GV, Shurin MR, Kisin ER, Murray AR, Young S-H, et al. Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure. *ACS nano*. 2011;5(7):5755-62.
34. Aldinucci A, Turco A, Biagioli T, Toma FM, Bani D, Guasti D, et al. Carbon nanotube scaffolds instruct human dendritic cells: modulating immune responses by contacts at the nanoscale. *Nano letters*. 2013;13(12):6098-105.

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.