

Avaliação sistêmica e local dos NTCs *in vivo*, por meio da avaliação da produção de MN em linfócitos periféricos e da MO, e da análise histológica do tecido subcutâneo após injeção dos CNTs

ANNA MARIA G. M. BARROS

Universidade Federal de São Carlos (Campus Sorocaba) – SP – Brasil
anna.radio@hotmail.com

VANESSA BARBIERI

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – SP – Brasil
vanessa.vbarbieri@gmail.com

ELAINE C. OLIVEIRA

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – SP – Brasil
laineoliveira@hotmail.com

SILVIA PIERRE IRAZUSTA

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza – SP - Brasil
silvia.pierre@hotmail.com

Resumo - Os nanotubos de carbono (NTC) têm atraído considerável atenção para vários tipos de aplicações, principalmente na área biomédica. Evidências toxicológicas, entretanto, são necessárias a fim de se prevenir os riscos à saúde ocupacional e garantir a aplicação segura dos NTCs no campo da biomedicina. O objetivo deste trabalho foi desenhar um estudo piloto para avaliar a resposta inflamatória tecidual e sistêmica à exposição aos nanotubos de carbono NT1 (MWCNT) desenvolvidos na Unicamp, em camundongos por meio da avaliação da potencial atividade genotóxica-mutagênica, bem como, pela resposta tecidual local. Os resultados mostraram que o NT1 apresentou atividade mutagênica em linfócitos periféricos e foi capaz de causar uma intensa resposta inflamatória local com infiltrado rico em macrófagos CD68+ e CD163+, corroborando com achados anteriores da literatura para outros nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).

Palavras-chave: Nanotubo de Carbono, Nanotoxicologia, Injeção Subcutânea de MWCNT, Mutagenicidade e Genotoxicidade.

Abstract - Carbon nanotubes have attracted considerable attention for various applications, especially in the biomedical area. Toxicological evidence, however, are necessary in order to prevent risks to occupational health and ensure safe application of CNT in biomedicine. The objective of this work was to design a pilot study to evaluate the inflammatory response and systemic exposure to carbon

nanotubes NT1 (MWCNT) developed on Unicamp, in mice by potential activity of mutagenic and genotoxic evaluation, as well as by local tissue response. The results showed that the NT1 showed mutagenic activity in peripheral lymphocytes and was able to cause an intense local inflammatory response infiltrate rich in macrophages and CD68 + CD163 +, corroborating previous findings from the literature for other Multi Walled Carbon Nanotube (MWCNT).

Keywords: Carbon nanotube, nanotoxicology, subcutaneous Injection MWCNT, mutagenicity and genotoxicity.

1. Introdução

Os NTC podem ser descritos como redes hexagonais laminadas de carbono que são seladas por moléculas de fluoreno. As dimensões destas estruturas tubulares têm intervalo de 0,4 a 2 nm de diâmetro para nanotubos de parede única, e de 2 a 100 nm para nanotubos de múltiplas paredes.

A possibilidade de combinar a notável especificidade e o processamento paralelo de biomoléculas com a cavidade oca, o tamanho e as propriedades elétricas de NTC (figura 1), tem atraído considerável atenção para vários tipos de aplicações, que vão desde a criação de novos tipos de biosensores (CHEN *et al.*, 2003) até a fabricação de drogas ou dispositivos de aplicação de vacinas (“drug delivery”) (GEORGAKILAS *et al.*, 2002; PANTAROTTO *et al.*, 2003a, b, 2004; WONG SHI KAM *et al.*, 2004).

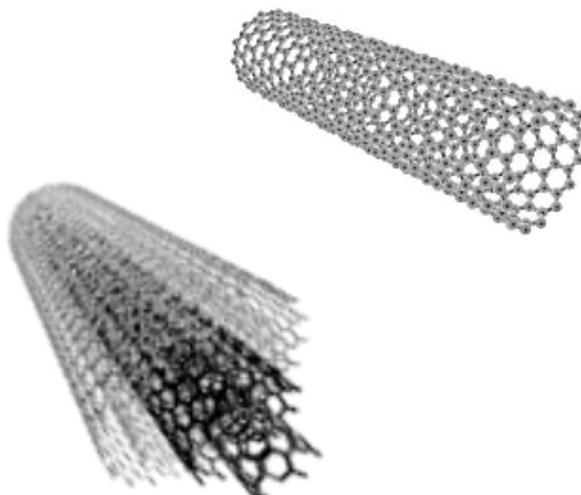


Figura 1 -Estrutura do Nanotubo de carbono de parede múltipla e simples

Fonte:http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000700033&script=sci_arttext

Existem três tipos principais de NTC, os de parede simples (SWNTs) (figura 2a), os de paredes duplas (DWNTs) (figura 2b) e os de paredes múltiplas (MWNTs) (figura 2c). Os NTC podem ser sintetizados usando os métodos de arco-descarga (AJAYAN *et al.*, 1993), e deposição a partir de CVD (DAI *et al.*, 1996) e ablação de laser (GUO *et al.*, 1995). Em aplicações biomédicas, os NTC são vastamente explorados (LIU e WEBSTER, 2007).

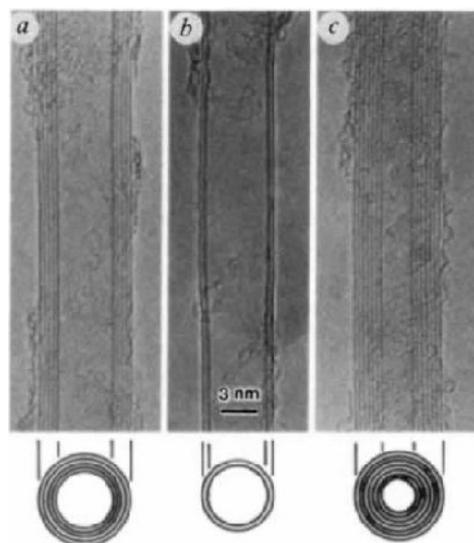


Figura 2 -Nanotubos de carbono: (a) DWNT, (b) SWNT, (c) MWNT
Fonte: IIJIMA, 1991

Estudos toxicológicos sugerem que as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos do ponto de vista fisicoquímico, podem também ser responsáveis por alterações nocivas ao organismo (PASCHOALINO et al., 2010). Pode-se ter como exemplo, a capacidade de aglomeração/dispersão que facilita a translocação das nanopartículas pelos compartimentos ambientais e causar, de forma cumulativa, danos a cadeia alimentar. Devido ao tamanho de sua estrutura, os nanotubos de carbono, podem ter permeabilidade maior através da pele, mucosa e membranas celulares, além de ter seu efeito tóxico aumentado, já que o grande número de átomos na superfície da partícula promove uma reatividade superior (NEL et al., 2006).

O micronúcleo (MN) é o resultado da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por agentes que afetam o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se orientam para os núcleos filhos de uma célula em divisão, que ficam perdidos no citoplasma e formam a própria membrana nuclear, originando os MN. Assim, a presença MN em células somáticas é indicativa de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou de distúrbios do fuso mitótico (aneugênese) (NATARAJAN, 2002). Estudos recentes comprovam que o MWCNT, quando avaliado seu potencial genotóxico em sistemas de teste de mamíferos, pode causar respostas genotóxicas tais como aberrações cromossômicas e rupturas de cadeia de DNA em experimentos utilizando *Allium cepa*, linfócitos humanos, células de camundongos e de medula óssea. (GHOSH et al., 2010).

Diante da crescente evidência de trabalhos, cujo mecanismo envolvem interação de nanopartículas-DNA, surge a Nanotoxicologia, voltada para o estudo dos efeitos tóxicos das NPs sobre a estabilidade e integridade genômica. Logo, a nanotoxicologia, surgiu com o objetivo de avaliar os riscos associados aos nanomateriais, explorando as vias de entrada de nanopartículas e estudar os mecanismos moleculares de toxicidade das mesmas (OBERDÖRSTER et al., 2005).

2. Metodologia

2.1 Nanotubos de carbono:

Foram fabricadas no laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng) do Depto. de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP.

2.2 Animais:

O estudo foi realizado em grupos de 3 camundongos fêmeas *Swiss albinos* de 6-8 semanas, obtidos do centro de biotério da UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos em micro isoladores no biotério do Laboratório de Cultura Celular e Nanotecnologia da FATEC-SO. Alimento e água foram oferecidos *ad libitum*. A dose testada foi de 100 µg de NTC dissolvidos em 100µL de tampão fosfato-salina (PBS) ou metrotexato, injetados subcutaneamente no dorso do animal, ou e.v., através do plexo ocular. O tempo de avaliação foi de 72 h após injeção, quando os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Por ocasião do sacrifício os animais tiveram o tecido subcutâneo do local da injeção ressecado e os linfonodos axilares retirados.

2.3 Pesquisa de Micronúcleo (MN):

A medula óssea foi coletada em RPMI 1640 (Sigma Chem, MO, USA) enriquecido de 5% de soro bovino fetal (Microbiológica – RJ). Centrifugou-se a suspensão celular por 5 minutos a 2000 rpm descartando-se, depois, o sobrenadante. Foi corado com Giemsa. A contagem de MN foi realizada em microscópio óptico comum, aumento de 400X.

2.4 Coleta de sangue periférico e confecção de lâminas:

A coleta do sangue foi realizada dentro das normas de ética para manipulação dos animais de experimentação da Unicamp e a execução foi realizada por profissional habilitado, obedecendo todos os critérios para evitar riscos de contaminação. As lâminas utilizadas para esfregaço de sangue periférico foram coradas com Leishman. O sangue periférico dos camundongos foilevados ao laboratório, onde se executou a análise de RDW, num citômetro de fluxo, Sysmex KX-21N.

2.6 Processamento do Tecido:

Após a coleta, o material do dorso foi imediatamente colocado em paraformaldeído 4%, por 18 h em geladeira. Após lavagens as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em Parafina. Foram feitos cortes de 4--5µm, em lâminas silanizadas. Para todos os cortes foi realizada a coloração de H&E

2.7 Técnica imunohistoquímica:

Após procedimento de desparafinização as lâminas foram reidratadas em xilóis e álcoois de concentrações decrescentes. A Recuperação Antigênica foi realizada em tampão citrato 10mM pH 6.0 em panela à vapor, por 30 minutos. O Bloqueio da Peroxidase Endógena foi em solução de H₂O₂ 3% em Metanol ou H₂O_d (2x10 min). Foi realizado o bloqueio dos Sítios Inespecíficos com leite Molico Cálcio 3% por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários (CD68-Dako S613, 1:50 e Cd163-Serotec 333602, 1:80) descritos foram diluídos em PBS-BSA 1%. Cada corte recebeu 50µl de anticorpo primário e foi

mantido a 4°C em câmara úmida durante 16-18 horas. Após incubação com anticorpos primários, as lâminas foram reincubadas em câmara úmida com 50µl do anticorpo secundário (KIT Envision DAKO) por 30 min à 37°C. O cromógeno usado foi a diaminobenzidina (DAB KIT K348 DAKO) por 5 a 8 segundos. A contracoloração foi realizada pela imersão em Hematoxilina de Erlich por 1 min.

3. Resultados e Discussão

Toxicidade Sistêmica

Experimentos utilizando contagem de MN em linfócitos de camundongos são utilizados devido à sua confiabilidade e principalmente, pela facilidade de obtenção dos resultados.

Alguns autores utilizam essa metodologia para testar vários tipos de substâncias, porém, mesmo os trabalhos que não incluem os NTC, como por exemplo, onde se avaliou a efeito da Curcumina sobre linfócitos humanos, pelo Teste do MN (FIDALGO, 2007). Nesse trabalho o autor utiliza a técnica de contagem de MN para comprovar que a curcumina não causa efeito mutagênico nos linfócitos. Outros trabalhos utilizando NTC, demonstram que efeitos tóxicos podem sim, causar algum tipo de toxicidade ou genotoxicidade, como é o caso do trabalho de NYGAAD et al, 2009, onde se comprova que MWCNT e de SWCNT, uma vez expostos no organismo de camundongos são capazes de promover resposta alérgica, com liberação de citocinas inflamatórias.

A nanotecnologia é uma matéria global e interdisciplinar que tem um extraordinário potencial transformador por aprimorar produtos existentes e/ou desenvolver novos. Seus benefícios têm sido discutidos à luz da segurança do seu uso. Este estudo foi desenhado visando o possível emprego do NT1, desenvolvido na Unicamp como ferramenta para “*drugdelivery*”. O NT1, que foi o NTC em estudo pelo nosso grupo, não apresentou mutagenicidade, pela exposição aguda, no modelo avaliado e também não foram observados efeitos nas células hematopéticas da medula óssea, porém a avaliação foi realizada após curto período de exposição. Mesmo no caso do Methotrexato (MTX), apesar das alterações a nível de DNA, não foram acompanhadas por correspondente alterações nos valores de RDW. Este índice fornece a expressão numérica da variação no tamanho das células vermelhas, ou seja, anisocitose, hemácias de tamanhos variados, provavelmente uma consequência de deficiências associadas ou de fornecimento intermitente na medula óssea dos elementos necessários para a formação da hemoglobina e para as divisões celulares. (NASCIMENTO e FERREIRA, 2003)..

Os resultados podem ser observados nas tabelas 1 e Figura 2 e Tabela 2a seguir:

Tabela 1 -Índice de Mn nos linfócitos periféricos e MO

Produção de Mns em camundongos tratados com NT1 e MTX			
	Sp cont. negativo	Sp NT1	Sp MTX
Lâmina 1	6	1	28
Lâmina 2	5	12	64
Lâmina 3	6	10	39
Média	5,6	7,6	43,6
DP	0,57	5,85	18,44
	MO cont. negativo	MO NT1	MO MTX
Lâmina 1	0	3	0
Lâmina 2	0	1	0
Lâmina 3	0	3	0
Média	0	2,3	0
DP	0	1,15	0

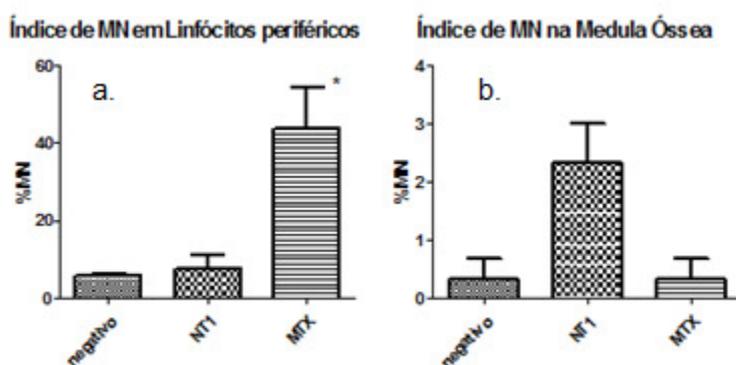


Figura 1 -Índices de Micronúcleos: em a. linfócitos periféricos, *=p<0,05, e em b.medula óssea.

Tabela 2 -Resultado do RDW do sangue periférico dos camundongos

Sp Cont. negativo	RDW SD	RDW CV
Lâmina 1	(-) 28,6 fL	12,80%
Lâmina 2	(-) 27,1 fL	11,40%
Lâmina 3	(-) 28,7 fL	15,80%
MÉDIA	(-) 28,1 fL	13,30%
Sp NT1	RDW SD	RDW CV
Lâmina 1	(-) 28,7 fL	12,60%
Lâmina 2	(-) 28,6 fL	13,80%
Lâmina 3	(-) 27,6 fL	11,90%
MÉDIA	(-) 28,3 fL	12,70%
Sp MTX	RDW SD	RDW CV
Lâmina 1	(-) 28,0 fL	12,60%
Lâmina 2	(-) 27,5 fL	12,50%
Lâmina 3	(-) 27,8 fL	12,00%
MÉDIA	(-) 27,7 fL	12,30%

Os resultados mostraram que MWCNT poderiam causar aberrações cromossômicas, fragmentação do DNA e apoptose em células de raiz de *Allium cepa* que pode ser correlacionado com a internalização de MWCNT nas células da planta. Em linfócitos humanos resposta genotóxica significativa foi observada na concentração de 2ug / ml. (GHOSH et al., 2010). Concentrações mais elevadas provocaram a diminuição dos valores de DNA que podem ser devidos à formação de ligações cruzadas. Efeitos genotóxicos foram mostrados por MN frequentes em experimentos com células de medula óssea de camundongo. Com base nos resultados do estudo, o MWCNT pode ter um impacto significativo sobre as atividades genômicas dessas células (GHOSH et al., 2010).

O presente trabalho avaliou o NT1, injetado sistemicamente no organismo de camundongos e como controle positivo de referência, foi utilizado o Metotrexato.

O MTX (4-NH₂-10-CH₃- ácido fólico; MTX) é um fármaco classificado como antagonista do ácido fólico (ou folato), pertencente à classe de antimetabólicos.

Além disso, o MTX tem sido largamente empregado como um agente antiinflamatório e imunossupressor na terapia ou artrite reumatóide, psoríase e lupuseriematoso sistêmico. (WALLACE e SHERRY, 1995)

Com base no mecanismo de ação e toxicidade do MTX por meio de depleção de folato, estudos têm sido realizados com suplementação diária de folato, bem como administração de ácido folínico após o metotrexato, com diminuição dos efeitos colaterais, sem perda de eficácia. (WALLACE e SHERRY, 1995)

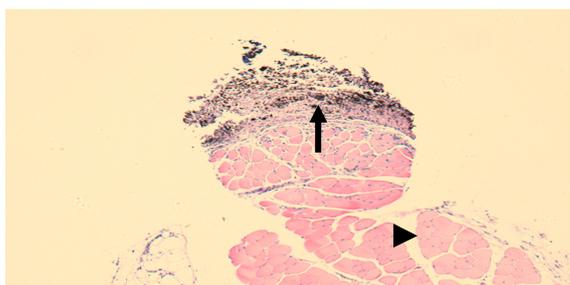
Resposta Local do Tecido Subcutâneo

Os resultados aqui apresentados mostraram que o NT1 migrou para o tecido conjuntivo, abaixo do tecido muscular conforme se observa da figura 2a e b. Nota-se também (figura 3) que o NT1 induziu infiltrado celular rico em macrófagos identificados pelos marcadores CD68+ e CD163+ (Figura 4) pela técnica de imunoperoxidase. A análise das imagens mostrou ainda, que as fibras musculares apresentaram aspecto morfológico irregular com edema.

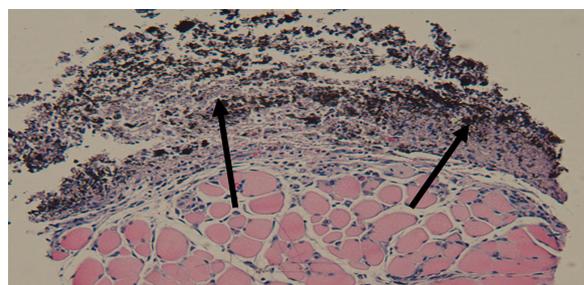
A reação imunohistoquímica foi realizada para identificar a infiltração de células fagocitárias no local de aglomeração do NT1. O CD68 é uma proteína fortemente expressa nos grânulos citoplasmáticos, e na superfície de macrófagos, monócitos, neutrófilos, basófilos e células natural killer (NK). Além disso, o CD68 é expresso por cerca de 40% de células B de sangue periférico. Os CD68 também podem ser encontrados inespecificamente em glomérulos e túbulos renais. Ao contrário de muitos antígenos, a molécula de CD68 é antigenicamente muito heterogênea, e diferentes anticorpos para CD68 mostram diferentes reatividades celular no citoplasma de tecidos não hematopoiéticos (FALINI *et al.*, 1989). O anticorpo DaKo aqui empregado, clone ED1, tem especificidade para macrófagos residentes.

A proteína identificada pelo CD163 é uma molécula de 134 KD, sendo expressa primeiramente em macrófagos, células Kupffer, monócitos, subconjuntos de células dendríticas, e um subconjunto de células hematopoiéticas progenitoras. A proteína de membrana CD163 pode ser clivada por metaloproteínases (MMP), resultando na forma solúvel. O nível sérico elevado de proteína CD163 tem sido implicada em muitos tipos de doenças inflamatórias. O anticorpo Serotec aqui empregado corresponde ao clone ED2, que caracteriza

uma subpopulação de macrófagos migrantes ao local da injúria tecidual (BARBE, *et al* 1990).



2a



2b

Figura 2a - Corte transversal do tecido subcutâneo, mostrando as fibras musculares e as nanopartículas no tecido conjuntivo subjacente (setas). Em *a* observa-se edema entra as fibras musculares (cabeça de seta) , aumento 200X e em *2b*, aumento de 400X.

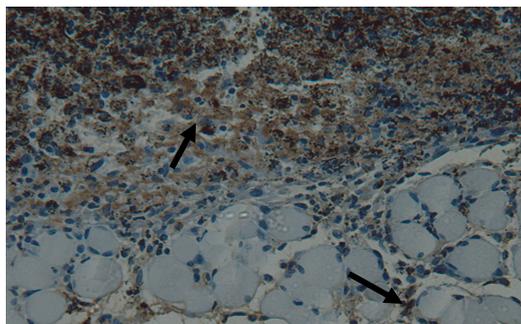


Figura 3

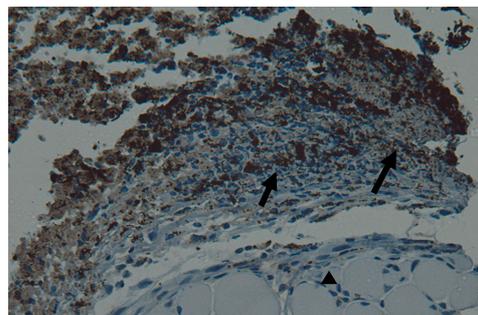


Figura 4

Figura 3 -Corte transversal do tecido subcutâneo mostrando infiltrado inflamatório rico em macrófagos CD68+ entre as fibras musculares (cabeça de seta) próximas e entre os NT1 (setas). Aumento 400X.

Figura 4 -Corte transversal do tecido subcutâneo mostrando infiltrado inflamatório rico em macrófagos CD163+ entre as fibras musculares próximas e entre os NT1s. Aumento 400X.

A exposição via subcutânea às nanopartículas por instilação intratraqueal ou por inalação, mostrou o potencial destas espécies em induzir uma resposta inflamatória aguda no pulmão, com liberação de substâncias pró-inflamatórias. Estes modelos fornecem um embasamento para avaliar os efeitos dos NTC em relação ao desenvolvimento de respostas imunes (NYGAARD *et al.*, 2009; SHVEDOVA *et al*, 2008;. STERNE MCNEIL, 2008).

Os MWCNTs podem induzir a ativação do complemento e a produção de citocinas pró-inflamatórias, após a injeção em camundongos, e os níveis de complemento e citocinas voltam aos níveis normais ao longo do tempo, neste caso, quando o modelo foi a injeção subcutânea de MWCNTs. De tal modo que, no local onde houve a administração subcutânea de MWCNTs houve indução de reações imunológicas de curto prazo, as quais puderam ser eliminadas com o tempo (MENG *et al.*, 2010).

Alguns estudos avaliaram outras nanopartículas, como as de dióxido de titânio, (TiO₂) sua distribuição nos tecidos e seus efeitos histopatológicos após a

administração subcutânea em camundongos . Foram injetados por dois dias consecutivos e examinados por 1 e 3 dias, e 2, 4, 12 e 26 semanas após a última injeção. Quando examinados, os aglomerados das nanopartículas foram observados principalmente nos órgãos, como: pulmão, baço e fígado, os quais apresentaram resposta do tipo reação de corpo estranho no local de injeção e o aparecimento de um aumento no número de macrófagos no pulmão e no fígado, no entanto, não houve evidência histopatológica de danos nos tecidos observados. (UMBREITA, *et al.*,2012).

O tempo de exposição também é um fator a ser considerado, já que neste trabalho fizemos um único tempo, de 72hs de exposição, enquanto a literatura mostra a influência destes tempos, já que um parâmetro importante em qualquer ensaio de *in vitro* ou *in vivo* é a duração da exposição, o que normalmente não excede 24 horas para os compostos químicos, devido à sua capacidade de se difundir em células e da duração da sua meia-vida. (DOAK *et al.* 2009). No entanto, a absorção e movimentação de nanomateriais através da célula são susceptíveis de ser mais lentos do que difusão química e, assim, os períodos de exposição mais longos podem ser necessários para efeitos tais se desenvolverem. Até o momento, não há tempos de exposição maiores que 24 h, com exceção de uma investigação em nanopartículas de cobalto, cuja captação, em 48 h, foi o dobro da verificada em 24 h, (COLOGNATO, *et al.*,2008) e, em apoio a esta observação, também foi observado maior captação com o maior tempo para o USPION revestido de dextran (DOAK *et al.* 2009)

Em relação ao tempo de exposição, o destino de nanomateriais em longo prazo, uma vez no interior das células é outro fator atualmente desconhecido, sendo de importância significativa porque o nanomaterial propriamente, não pode representar um risco genotóxico, mas ao longo do tempo, pode quebrar ou se oxidar dentro das células, resultando na liberação de íons metálicos livres que, dependendo do elemento, pode ser mutagênico. Há evidência limitada para apoiar estes resultados na literatura até o momento. (DOAK *et al.* 2009). Apesar da presença do infiltrado inflamatório rico em células fagocitárias, não houve evidências de degeneração ou necrose.

Desta forma, a toxicocinética das nanopartículas, incluindo-se os NTCs, bem como seus mecanismos de absorção, o metabolismo tecidual, ou a sua distribuição nos órgãos, a acumulação e eliminação nas diferentes vias de exposição, constituem em conjunto, importantes fatores para a avaliação do risco para a saúde. (ZHAO e CASTRANOVA 2011).

5. Conclusões

Os NTCs aplicados sistemicamente por injeção e.v., produziram MNs nos linfócitos periféricos, mas a média (NTC: $7,6 \pm 4,7$) não foi estatisticamente diferente do controle negativo ($5,6 \pm 0,5$), indicando que, pelo menos nas condições e concentração testadas, o MWNTC NT1 não é mutagênico. Na avaliação histológica os NTCs migraram para o tecido muscular e induziram edema, com infiltrado celular inflamatório rico em macrófagos CD68+(residentes) e CD163+(infiltrantes), demonstrado pela técnica de imunoperoxidase. A análise mostrou ainda que as fibras musculares apresentaram aspecto morfológico irregular. Somente foi analisada a exposição aguda de 72 horas, outros períodos de exposição e outras doses deverão ser analisadas.

Referências

AJAYAN, P.M.; LAMBERT, J.M.; BERNIER, P.; BARBEDETTE, L.; COLLIEX, C.; PLANEIX, J.M..Growth Morphologies During Cobalt-Catalyzed Single-Shell Carbon Nanotube Synthesis. *Chem. Phys. Lett.* 215: 509–517, 1993.

BARBE, E. Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiol.*182: 8899. , 1990.

CHEN, R.J.; BANGSARUNTIP, S.; DROUVALAKIS, K.A.; SHI KAM, N.W.; SHIM, M.; LI, Y.; KIM, W.; UTZ, P.J. Noncovalent Functionalization Of Carbon Nanotubes For Highly Specific Electronic Biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 4984–89, 2003.

COLOGNATO, R., BONELLI, A., PONTI, J., FARINA, M., BERGAMASCHI, E.,SABBIONI, E. AND MIGLIORE, L. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*, 23, 377–382.6, 2008.

DAI, H.; RINZLER, A.G.; NICOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E. Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed dis-proportionation of carbon monoxide. *Chem. Phys. Lett.* 260: 471–475, 1996.

DOAK, S. H.; GRIFFITHS, S. M.; MANSHIAN, B.; SINGH, N.; WILLIAN, P. M.; BROWN, A. P.; JENKINS, G. J. S. Review: confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, v.24, n.4, p.285-293, 2009.

FALINI B, FLENGHI L, PILERI S, STEIN H, DÜRKOP H, PASQUALUCCI L, et al. M15.1. PG-M1 a new mAb directed against a fixative-resistant, macrophage-restricted epitope of the CD68 molecule. In: KNAPP W, DÖRKEN B, GILKS WR, RIEBER EP, SCHMIDT RE, STEIN H, et al., editors. *Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria.*Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; p. 928-30. 1989

FIDALGO, C. Análise do efeito in vitro do antioxidante curcumina e sua associação ao antitumoral bleomicina sobre os linfócitos humanos, pelo teste do micronúcleo. 2007.

GEORGAKILAS, V.; TAGMATARCHIS, N.; PANTAROTTO, D.; BIANCO, A.; BRIAND, J.P.; PRATO, M. Amino Acid Functionalization Of Water Soluble Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.* 24:3050–51, 2002.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*. 81(10):1253-62, 2010 .

GUO, T.M.; NIKOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E. Catalytic Growth Of Single-Walled Nanotubes By Laser Vaporization. *Chem. Phys. Lett.* 243: 49–54, 1995.

LIU, H E WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*:354-369, 2007.

MENG, J.; YANG, M.; JIA, F.; KONG, H.; ZHANG, W.; WANG, C.; XING, J.; XIE, S.; XU, H. Subcutaneous Injection Of Water-Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes In Tumor-Bearing Mice Boosts The Host Immune Activity. *Nanotechnology* 21/145104: 1-9, 2010.

NASCIMENTO, M.L.P.; FERREIRA, F.C. Por que na relação entre a concentração de hemoglobina globular média e a contagem de hemácias a avaliação do RDW-SD é importante? *NewsLab, São Paulo*, 61: 94-104, 2003.

NATARAJAN, A. T. Chromosome Aberration: Past, Present And Future. *Mutation Research, Orlando*, v. 504, n.6, p. 3 -16, Oct. 2002.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potencial of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, p.622-627, 2006.

Nygaard, U., C. Hansen, J., S. Samuelsen, M. Alberg, T. Marioara, C., D. e and Løvik, M. Single-Walled and Multi-Walled Carbon Nanotubes Promote Allergic Immune Responses in Mice. *Toxicological Sciences* 109(1), 113–123 ,2009.

OBERTDÖSTER, G. OBERTDÖSTER, E. E OBERTDÖSTER, J. Nanotoxicology: naemergeng discipline evolving from studies os ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* (113): 823839,2005.

PANTAROTTO, D.; PARTIDOS, C. D.; GRAFF, R.; HOEBEKE, J.; BRIAND, J. P.; PRATO, M.; BIANCO, A. Synthesis, Structural Characterization, And Immunological Properties Of Carbon Nanotubes Functionalized With Peptides. *Am. J. Chemo. Soc.* 125: 6160–4, 2003a.

PANTAROTTO, D.; PARTIDOS, C. D.; HOEBEKE, J.; BROWN, F., KRAMER, E.; BRIAND, J. P.; MULLER, S.; PRATO, M.; BIANCO, A. Immunization With Peptide-Functionalized Carbon Nanotubes Enhances Virus-Specific Neutralizing Antibody Responses. *Chem. Biol.* 10: 961–6, 2003b.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S; JAEDIM, W. F. *Os nanomateriais e a questão ambiental*. *Quím Nova*. 33(2):421-30.2010.

SHVEDOVA, A. A., KISIN, E., MURRAY, A. R., JOHNSON, V. J., GORELIK, O., AREPALLI, S., HUBBS, A. F., MERCER, R. R., KEOHAVONG, P., SUSSMAN, N. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: Inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell.Mol. Physiol.* 295, L552–L565, 2008.

STERN, S. T., AND MCNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol.Sci.* 101, 4–21, 2008.

Umbreita, T. H. Francke-Carrollb, S., Weaver, J. L., Miller, T. J., Goering, P. L., Sadrieh, N. and Stratmeyera, M. E. Tissue distribution and histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles after intravenous or subcutaneous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.*; 32: 350–357. 2012.

WALLACE, C. A.; SHERRY, D.D. A Practical Approach to Avoidance of Methotrexate Toxicity. *J R heumatol*; 22 (6):1009-1012. 1995.

WONG SHI KAM, N.; JESSOP, T.C.; WENDER, P.A.; DAI, H. Nanotube Molecular Transporters: Internalization Of Carbon Nanotube-Protein Conjugates Into Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6850–51, 2004.

ZHAO, J., CASTRANOVA, V. Toxicology of Nanomaterials used in Nanomedicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14:593–632, 2011.