

ARTIGO

Interações de nanotubos de carbono e fulerenos com o sistema imune da pele e as possíveis implicações relacionadas à nanotoxicidade cutânea

Interactions of carbon nanotubes and fullerenes with the immune system of the skin and the possible implications related to cutaneous nanotoxicity

**Ana Luiza Castro
Fernandes**

*Hospital Federal dos
Servidores do Estado do
Rio de Janeiro (HFSE-RJ),
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: analuizacf@gmail.
com*

William Weissmann

*Escola Nacional de Saúde
Pública Sérgio Arouca,
Fundação Oswaldo Cruz
(ENSP/Fiocruz), Rio de
Janeiro, RJ, Brasil*

RESUMO

O entendimento da interação de nanotubos de carbonos e fulerenos com os constituintes da pele, em especial o sistema imune de pele, é relevante para a determinação de parâmetros toxicológicos. Realizou-se revisão voltada a tais aspectos. Parte considerável das referências encontradas concentrou-se nos efeitos citotóxicos e de permeação da pele. Em menor escala, há artigos sobre ativação e imunomodulação de células e outros elementos imunes. Poucos trabalhos encontrados tratam, especificamente, da resposta imunológica cutânea, limitando o conhecimento relacionado. Os achados sugerem que os nanomateriais analisados possam estar envolvidos em quadros dermatológicos, como dermatite de contato irritativa, reações anafilactoides, urticária e angioedema, e suscitam a necessidade de que se realizem estudos adicionais para confirmação dos achados. A padronização da descrição e testagem de características dos nanomateriais empregados em experimentos pode facilitar a comparação dos resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Fulerenos; Nanotubos de carbono; Alergia e Imunologia; Dermatopatias

Abstract

The understanding of the interaction of carbon nanotubes and fullerenes with the constituents of the skin, especially the skin immune unit, is relevant to the determination of toxicological endpoints. A systematic review was done focused on such aspects. Considerable part of the found references concentrated in cytotoxicity and skin permeation. On a smaller scale, there are articles on immunomodulation and activation of immune cells and other elements. Few of the found studies deal specifically with cutaneous immune response, limiting the related knowledge. The findings suggest that nanomaterials studied may be involved in skin problems such irritant contact dermatitis, anaphylactoid reactions, urticaria, angioedema, and raised the need for performing additional studies to confirm the findings. The standardization of the description and testing of nanomaterials characteristics used in experiments can facilitate comparison of results.

KEY WORDS: Fullerenes; Carbon Nanotubes; Allergy and Immunology; Skin Diseases



Introdução

A nanociência vem se desenvolvendo rapidamente, de forma que nanomateriais são encontrados hoje em vários produtos, como eletrônicos, alimentos, medicamentos e utensílios da indústria e de uso doméstico.

Para que um material seja considerado produto da nanotecnologia deve ter pelo menos uma de suas dimensões na escala de 1 a 100 nm¹. Essa dimensão nanométrica faz com que grande parte do volume de átomos de uma molécula encontre-se na sua superfície, o que garante enorme reatividade dessas estruturas, com múltiplas aplicações².

Dentre os nanomateriais, os alótropos do carbono, como fulerenos e nanotubos de carbono, destacam-se por serem dos mais produzidos e pela diversidade de aplicações³. Por essa razão, é crescente a preocupação sobre os riscos ao ambiente e à saúde associados à exposição ocupacional ou não a esses nanomateriais, especialmente através da pele e das vias respiratórias^{4,5}.

A pele é um dos principais meios de interação do homem com o ambiente e nessa condição exerce um importante papel de proteção contra agressões de natureza física, química e biológica^{6,7}. A exposição cutânea aos nanomateriais pode ocorrer através da aplicação direta de um medicamento que contenha nanocarreadores ou tecido tratado com nanopartículas, por exemplo, ou de forma involuntária, no meio ambiente e indústrias ao contato com matérias-primas ou resíduos de processos produtivos⁸.

Diversos questionamentos referentes à interação de nanomateriais com a pele são feitos, como a penetração através de barreiras fisiológicas íntegras e danificadas, citotoxicidade, indução de estresse oxidativo e inflamação, além da mutagenicidade⁹.

Como qualquer nova substância química, potencialmente, os nanomateriais encerram riscos de dermatite de contato alérgica ou por irritante, uma vez que essas estruturas podem representar novos alérgenos, haptenos, agentes de reações cruzadas, além de produzir danos ainda desconhecidos¹⁰. Assim, muitos dos riscos estimados da interação de nanomateriais com a pele envolvem em sua fisiopatogenia elementos da resposta imunológica cutânea. O entendimento de cada passo envolvido nesse processo é relevante para a construção do conhecimento acerca da nanotoxicidade cutânea.

Alótropos do carbono

Os alótropos do carbono representam um dos nanomateriais mais investigados na atualidade por sua ampla aplicabilidade nas áreas médica e tecnológica. A hibridização específica do carbono, as ligações estabelecidas entre os átomos, a conformação irão determinar a natureza do alótropo, podendo este ser um nanotubo de carbono (CNT), fulereno, grafeno, grafite ou diamante¹¹.

Os fulerenos possuem uma estrutura esférica oca¹², de forma que os átomos de carbono estão organizados em anéis policíclicos¹³. Diferentes tipos de fulerenos podem ser gerados

de acordo com o radical presente na sua superfície, o seu processo de síntese e o número de átomos de carbono utilizados, tendo por exemplo o C₆₀ e o C₈₀⁵.

Atualmente, os fulerenos têm sido utilizados na síntese de sistemas carreadores de drogas, cosméticos, lubrificantes, catalisadores, polímeros modificados e artigos esportivos⁵. Devido à capacidade de reagir com diferentes espécies químicas, especialmente radicais livres, como superóxidos, hidroxilas e liporradicais^{14,15}, os fulerenos têm sido empregados em cosméticos como antioxidantes. Esse efeito é potencializado ainda pela ação inibitória desse nanomaterial sobre o citocromo P450 dependente da mono-oxigenase¹⁶. Ainda devido ao efeito antioxidante, o uso tópico de fulerenos também tem sido proposto no tratamento da acne, com possível benefício na redução do sebo e da infiltração de neutrófilos¹⁷. A capacidade de fulerenos reduzirem a síntese de radicais livres, induzida pela exposição às radiações ultravioleta A (UVA) e B (UVB), parece favorecer, também, o emprego desses nanomateriais em filtros solares^{18,19}. Outra característica é a capacidade de inibir a melanogênese induzida pela radiação UVA em melanócitos humanos, podendo ser aplicados como agentes despigmentantes²⁰.

Os CNT são compostos por uma ou mais paredes de grafeno encurvadas^{21,22}. De acordo com o número de paredes, há três tipos de nanotubos de carbono: parede única (SWCNTs), parede dupla (DWCNTs) e o de múltiplas paredes (MWCNTs), que diferem ainda quanto ao diâmetro²³.

Durante a síntese dos nanotubos de carbono, frequentemente, quantidades significativas de ferro²⁴, níquel²⁵ e cobalto ficam retidas no seu interior²⁶, já que são catalisadores utilizados no processo^{24,26}. Esses metais contaminantes podem ter efeito biológico ao atuarem como catalisadores de reações de estresse oxidativo²⁴, induzindo a formação de radicais livres, acúmulo de peróxido e depleção de antioxidantes²⁷, além de poderem tomar parte em respostas inflamatórias agudas²⁸.

Devido às suas propriedades mecânicas, estruturais e de transporte diferenciadas, os CNT têm sido usados na síntese de nanocarreadores de drogas, biossensores, plásticos resistentes, blindagem eletromagnética, microscópios de varredura por sonda, fibras resistentes, além de outras utilidades na área médica e nas indústrias aeroespacial, de computação e de eletrônicos^{13,25, 29,30,31}.

Uma aplicabilidade dos CNT têm sido a de vetores para o transporte de moléculas terapêuticas³², permitindo o desenvolvimento de vacinas mais imunogênicas³³ e de drogas com ação sítio-específica, reduzindo efeitos colaterais³⁴.

As superfícies dos CNT e fulerenos são quimicamente inertes, dificultando a interação com estruturas biológicas²³. A funcionalização consiste na ligação de grupos funcionais e compostos às superfícies. Pode-se dar por ligações covalentes ou não covalentes, como as proporcionadas pelos aminoácidos ou grupos hidroxilas, à superfície dos nanomateriais³⁵, determinando novas propriedades físico-químicas²⁷. Algumas das consequências desse processo são o aumento da solubilidade



dos CNT e fulerenos em água, potencializando sua interação com elementos biológicos, a mobilidade dessas estruturas entre diferentes compartimentos nos organismos^{23,36} e o desvenilhamento de elementos do sistema imunológico, aumentando a biodisponibilidade das substâncias carregadas³⁷.

A interação de alótropos do carbono com elementos do sistema imunológico já é conhecida, especialmente, porque essas estruturas vêm sendo utilizadas em vacinas, inclusive de aplicação intradérmica e intramucosa³⁸. O detalhamento dos potenciais pontos de interação com o sistema imunológico da pele visa não somente à busca por novas aplicações desses nanomateriais como prever possíveis complicações relativas ao estímulo prolongado da resposta imunológica.

O sistema imunológico cutâneo

A pele encontra-se continuamente exposta a uma infinidade de antígenos e irritantes, o que leva à necessidade de um sistema imunológico eficaz e diferenciado. A diversidade da resposta imunológica cutânea levou à sugestão, no século passado, da existência de um tecido linfóide específico associado à pele, denominado SALT (*Skin Associated Lymphoid Tissue*)⁶ e posteriormente SIS (*Skin Immune System*)³⁹.

Quanto ao tipo de resposta imune, na unidade imunológica cutânea encontram-se elementos da imunidade inata e adaptativa, além daqueles que fazem a mediação entre os dois tipos de respostas.

A barreira física cutânea

A pele é composta por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme, que diferem estruturalmente e quanto à função⁴⁰. Sua organização estrutural representa uma barreira física.

A camada córnea é composta pelos corneócitos⁴¹, que estão ligados uns aos outros através dos corneodesmossomas e são envoltos por uma matriz extracelular rica em lipídeos apolares, organizados em bicamada. Na epiderme os queratinócitos são recobertos pela córnea e organizados de forma a dificultar a penetração dos micro-organismos e substâncias químicas potencialmente nocivas⁴². Eles são as células predominantes e se organizam em quatro camadas (basal, espinhosa, granulosa e estrato córneo), estando ligados entre si através dos desmossomas e à camada basal através dos hemidesmossomas. Essas células não são inertes e participam da resposta imune ao secretarem citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, componentes da via do complemento e metabólitos do ácido araquidônico^{43,44,45}, além de fagocitarem bactérias e fungos⁴⁴. Intercalados entre os queratinócitos encontram-se os melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, além de uma população flutuante de células inflamatórias⁴⁰.

Logo abaixo da epiderme, observa-se a membrana basal, seguida da derme, onde se encontra uma diversidade de células residentes, como fibroblastos, mastócitos, macrófagos, células inflamatórias transitórias, além dos apêndices cutâneos e os plexos vascular e nervoso^{40,45}. Os anexos cutâneos consistem na unidade pilosebácea e nas glândulas sudoríparas.

A penetração transcutânea de produtos químicos se faz através da difusão passiva, respeitando diferentes gradientes de concentração⁴⁶, sendo que geralmente apenas partículas pesando até 500 Da seriam capazes de atravessar a pele⁴⁷. De uma forma geral, em relação ao tamanho, estruturas de até 1000 nm permeiam a pele íntegra em zonas flexurais, ao mesmo tempo que, nas outras regiões, se a pele tiver solução de continuidade, partículas de até 7.000 nm são capazes de atingir estratos cutâneos mais profundos¹⁰. Esse processo possui alguns obstáculos físicos, como a camada córnea, uma estrutura essencialmente lipofílica⁴⁸.

As glândulas sudoríparas e os folículos pilosos representam pontos de menor resistência à permeação de substâncias na pele, por apresentarem aberturas diretas na superfície cutânea⁴⁸. De uma forma geral, a literatura cita que partículas inferiores ao diâmetro da abertura folicular, algo entre 10-210 µm, seriam capazes de permear a pele através dessa via⁴⁸.

Células envolvidas na resposta inata cutânea

Os neutrófilos são dos principais componentes da resposta imune inata, embora não estejam naturalmente presentes na pele⁴⁸. Já os monócitos deixam a circulação sanguínea e chegam à pele, transformando-se em macrófagos⁴⁹, e se encontram em grande número, principalmente na derme, próximos à membrana basal^{50,51}.

As células apresentadoras de antígenos são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos às células T nos linfonodos, contribuindo para a imunidade adquirida⁵². Na pele são observadas duas populações dessas células, sendo elas as células de Langerhans (LC) e as células dendríticas dérmicas⁵³.

As LC são um subtipo de células dendríticas imaturas presentes na epiderme⁵⁴, nas camadas basal e suprabasal, cujos prolongamentos permitem a cobertura de uma área de 20% da epiderme, facilitando a captura de antígenos⁵⁵. Já as células dendríticas são encontradas predominantemente na derme e possuem funções semelhantes às células de Langerhans⁵³.

Os mastócitos presentes na pele localizam-se ao redor dos capilares, arteríolas e vênulas da derme e hipoderme⁵⁰. Já os basófilos estão presentes nas lesões de algumas doenças cutâneas, como dermatite atópica, urticária e prurigo, e se assemelham estrutural e funcionalmente com os mastócitos⁵⁶.

Os eosinófilos seguem um padrão de distribuição na pele semelhante ao de outros tecidos, estando em maior número nos processos de natureza alérgica e autoimune^{54,57,58}.

Elementos solúveis da resposta imunológica inata cutânea

As proteínas do sistema complemento chegam à pele por difusão através dos vasos com permeabilidade alterada por algum estímulo inflamatório⁵⁰. Outras células, como monócitos e macrófagos, residentes na pele ou atraídos pelo início da inflamação, também podem ser fonte dessas proteínas. A literatura já descreveu a síntese de diversos elementos do sis-



tema complemento pelos queratinócitos, como C3, C5, C7, C8, C9, fator B, fator H regulador do complemento e fator I, além de expressarem os receptores de complemento CR1, cC1qR, C5aR, CR 2 e citocinas reguladoras do sistema ⁵⁹.

Células envolvidas na resposta adaptativa cutânea: os linfócitos T e B

Os linfócitos T representam 1-3% da população de células epidérmicas ^{39,50,60}, enquanto os linfócitos B não são encontrados na pele ou na mucosa oral sem alterações ³⁹. Essas células T são linfócitos de memória CD45RO⁺ que expressam na superfície moléculas de adesão, como o antígeno cutâneo linfocitário (CLA), além de receptores de quimiocinas e enzimas que irão contribuir para a migração até a pele ⁶¹.

Em condições de homeostase, os linfócitos T são encontrados na epiderme próximos à membrana basal e às células de Langerhans e na junção dermoepidérmica, ao redor das vênulas pós-capilares dos plexos superficial e profundo ^{50,39}.

Metodologia

Realizou-se revisão bibliográfica de artigos científicos, incluindo estudos clínicos e laboratoriais, relatos de caso, revisões, editoriais, cartas e domínios na internet referentes ao tema. O levantamento bibliográfico foi centrado no sistema imunológico, anatomia e particularidades da imunologia na pele, alótropos do carbono e interações entre estes. Foram considerados artigos e documentos publicados impressos ou na internet até 30 de novembro de 2011.

Para as buscas, foram utilizadas as bases de dados eletrônicas *Academic Search Premier* (EBSCO), *Cross Search* (Isi Web Services WOK), *Medline*, *Ovid MEDLINE*, *Scielo* e *Scopus*. Foram revistas, também, as bibliografias dos artigos encontrados, em busca de fontes não selecionadas. A pesquisa se restringiu aos idiomas inglês, francês, espanhol e português.

Realizou-se uma síntese sobre aplicabilidades e características físico-químicas relevantes dos nanomateriais em estudo, além de descrição breve da estrutura imunológica cutânea. Em seguida, prosseguiu-se o relato das possíveis interações dos nanomateriais abordados com cada elemento da resposta imunológica da pele.

Interação dos alótropos do carbono com elementos da resposta imunológica inata

Interação com os elementos da barreira física e permeação cutânea

A permeação de CNT e fulerenos em queratinócitos e outras células da pele vem sendo estudada não só para avaliação de efeitos tóxicos, mas visando-se também a possibilidade do desenvolvimento de matrizes para o carreamento de fármacos. Monteiro-Riviere et al ⁶² demonstraram que MWCNT são capazes de penetrar queratinócitos em cultura, sendo observados através de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) em

vacúolos citoplasmáticos. Bullard-Dillard et al ⁶³ descreveram a capacidade de o fulereno C₆₀ e de uma versão mais solúvel do nanomaterial, o fulereno C₆₀, derivado de sais de amônio quaternário, serem captados por queratinócitos humanos imortalizados. Observou-se que ambas as formas do fulereno foram captadas pelos queratinócitos, embora o derivado de sais de amônio se acumulasse de forma mais lenta. O mecanismo exato de permeação dos alótropos do carbono em queratinócitos não foi descrito, embora possivelmente essa internalização ocorra através de endocitose ou fagocitose ⁶⁴.

A análise dos efeitos citotóxicos de nanomateriais sobre células da estrutura cutânea é relevante, pois a destruição delas pode levar a alterações da barreira física, bem como à indução de citocinas que iniciem um processo inflamatório. Shvedova et al ²⁵ avaliaram o efeito de SWCNT em cultivo de queratinócitos HaCat e observaram a indução da síntese de radicais livres, acúmulo de derivados de peróxidos, redução de antioxidantes e consequente toxicidade aos queratinócitos. Os trabalhos sugerem, também, que, independentemente da concentração do nanomaterial no meio, há uma diferença de citotoxicidade entre os próprios CNT, respeitando a seguinte ordem: MWCNO < MWCNT < SWCNT ^{65,66}. Essa diferença pode ser justificada pelo diâmetro, de forma que estruturas menores encerrariam maior ação citotóxica. Já a citotoxicidade de fulerenos em queratinócitos é dependente da natureza do radical utilizado na funcionalização do nanomaterial e da concentração no meio ^{24,67}.

Os contaminantes metálicos, presentes como resíduos do processo de síntese desses nanomateriais, têm papel relevante na citotoxicidade por catalisarem reações que produzem radicais livres ²⁵. Murray et al ²⁶ expuseram pele artificial humana (EpidermFT) e células epidérmicas murinas JB6 P+ a SWCNT parcialmente purificados e não purificados, contendo ferro. Foi observado que as células JB6 P+ produziam radicais OH quando expostas ao SWCNT, sendo que o processo foi inibido ao se adicionar ao meio o quelante de metais dexferoxamina. Já a pele artificial, com células humanas na epiderme e derme, após a exposição a 75 µg de SWCNT, apresentava hiperqueratose, parakeratose, aumento das células basais na epiderme e dos fibroblastos na derme, além do aumento das fibras colágenas. Observou-se, ainda, aumento da síntese de citocinas inflamatórias à exposição ao SWCNT não purificado, especialmente de IL-6, IL-12 e IFN-γ. As associações da destruição de queratinócitos por ação citotóxica com as citocinas liberadas e alterações histológicas da pele permitem a consideração de possível dermatite de contato irritativa desencadeada por essa classe de nanomateriais ⁶⁸.

Necessariamente, a interação de nanomateriais com o sistema imunológico é dependente da capacidade de essas estruturas permearem a pele íntegra ou danificada por traumas ou processos inflamatórios. Essa permeação pode ocorrer através dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas, por via intercelular ou através das células, neste caso por processos como a endocitose, permeação direta da membrana celular ou transporte através de canais transmembrana, quando a nanopartícula for menor do que 5 nm⁵⁰.

Diversas características intrínsecas aos nanomateriais parecem ser relevantes para a análise da permeação cutânea,



como: tamanho, diâmetro hidrodinâmico, carga superficial, forma, composição, potencial zeta, agregação, metabolismo, deformidade, dentre outros ⁵⁰.

Existe ainda atualmente uma grande preocupação com os alótropos do carbono e a exposição de cunho ocupacional. Em estudos, procurou-se simular situações do processo laboral que pudessem alterar essa permeação, como a realização de movimentos repetitivos. Rouse et al ⁶⁹ demonstraram difusão passiva de fulerenos funcionalizados (Baa-Lys(FITC)-NLS) em pele porcina submetida a flexões repetidas prolongadas. A observação através de TEM mostrou que a penetração desses fulerenos ocorreu preferencialmente através do espaço intercelular e que após 24 horas eles se encontravam na camada granulosa. Xia et al ⁷⁰, na tentativa de simular exposição ocupacional, avaliaram o efeito de diferentes solventes sobre a penetração cutânea do fulereno C60- pristina na pele de porcos *Yorkshire*. Observou-se que apenas os fulerenos diluídos em tolueno, ciclo-hexano e clorofórmio foram encontrados em um nível profundo da camada córnea. Embora ressalvas devam ser feitas quanto à quantidade e concentração de nanomateriais utilizados nesses experimentos e a real concentração dessas estruturas no ambiente, deve-se ter atenção quanto às substâncias presentes no local de trabalho que possam potencializar a absorção cutânea e toxicidade de nanomateriais.

Interação com os neutrófilos

A maioria dos trabalhos relacionados à interação de alótropos de carbono com neutrófilos se concentra em sua análise nas vias respiratórias. Isso ocorre porque grande parte da exposição aos CNT e fulerenos pode se dar pelas vias aéreas, em situações ocupacionais ⁷¹ (Tabela 1).

Os neutrófilos internalizam os alótropos do carbono, funcionalizados ou não, e os armazenam em vesículas intracitoplasmáticas. A carga de superfície dessas estruturas parece influenciar a ação de enzimas neutrofílicas, de modo que SWCNT com carga de superfície negativa podem ser degradados por mieloperoxidases presentes em vesículas citoplasmáticas ⁷². Esse fato tem relevância, pois sugere que modificações na superfície de na-

nomateriais podem alterar a natureza biopersistente dessas estruturas, aumentando a biocompatibilidade e reduzindo efeitos tóxicos quando empregados, por exemplo, em fármacos como carreadores. Kagan et al ⁷² produziram CNT após modelagem em que sítios ativos à ação de mieloperoxidase neutrofílica foram produzidos nos CNT. O resultado foram compostos capazes de serem destruídos pela mieloperoxidase de animais de experimento, sem que produzissem lesões granulomatosas pulmonares, em contraste com aqueles sem os sítios, em questão.

Uma vez no interior da célula, os nanomateriais são capazes de influenciar os mecanismos de ação dos neutrófilos. Dessa forma, é possível que nanomateriais como os fulerenos, com ação antioxidante, neutralizem ROS de fagolisossomas. Como essas espécies de oxigênio são relevantes para a degradação de neutrófilos, pode haver redução da função com impacto na resposta imunológica a agentes infecciosos. Por outro lado, essa neutralização de ROS pode ser útil no tratamento de dermatoses inflamatórias, como a acne ¹⁷.

Entretanto, esse efeito depressor sobre a ação neutrofílica não foi observado no trabalho de Tsao et al ⁷³, quando se sugeriu que o carboxifulereno aumentava a viabilidade e o poder bactericida dessas células contra bactérias GRAM positivas. Além disso, outros trabalhos também demonstraram a ação pró-inflamatória de alótropos de carbono, principalmente os que tratam da instilação pulmonar dos nanomateriais, com aumento do infiltrado neutrofílico. Kagan et al ⁷² sugerem que os efeitos anti-inflamatórios encontrados com alótropos do carbono ocorrem quando as estruturas empregadas nos experimentos não estão funcionalizadas. Estudos adicionais precisam ser realizados para a avaliação dos fatores envolvidos nessas respostas divergentes.

Os trabalhos em cobaias sugerem que o contato da pele com SWCNT promove influxo de neutrófilos ao local, apenas, em doses elevadas, como 160 µg ²⁶. A localização preferencial do infiltrado das células ao redor de folículos permite o questionamento sobre uma possível permeação através dessas estruturas. Em estudos com CNT instilados em pulmões parece que o infiltrado neutrofílico só ocorre no tecido pulmonar se o nanomaterial não estiver agregado ⁷⁴.

Tabela 1. Resumo das interações de alótropos do carbono com células da resposta imunológica inata

	Neutrófilo	Macrófago	Mastócito	Células dendríticas
Permeação celular	Fagocitose Pinocitose?	Fagocitose Pinocitose?	Endocitose?	Fagocitose, Macropinocitose - Dependente do tamanho
Citotoxicidade	Não observada (peixe <i>minnows</i>)	- SWCNT: dependente do tamanho e da concentração no meio (Células avaliadas - Balb-c, RAW 264.7)	Não observada (mastócito humano)	- Resultados divergentes - Pode ser dependente da concentração (Células avaliadas: células dendríticas de ratos e humanas)
Alterações funcionais	-Reduz expressão de enzimas neutrofílicas -Inibe degranulação -Reduz mecanismo de <i>NETosis</i>	- Indução IL-6, TNF-α, TGF-β - Divergência quanto a indução de moléculas de superfície - Contaminante metálico :altera potencial redox Indução de granulomas cutâneos	- Aumento do influxo cutâneo - CNT: aumenta degranulação - Fulereno : reduz degranulação	- CNT: não observadas - Fulerenos - indução de citocinas e moléculas de superfície



Interação com macrófagos

A fagocitose de nanopartículas por macrófagos depende de propriedades físico-químicas dessas estruturas como tamanho, solubilidade, carga de superfície e funcionalização⁷⁵. Assim, as nanopartículas maiores e com carga na superfície teriam maior chance de serem internalizadas por esse processo.

A opsonização de nanopartículas, com a adesão de anticorpos e frações do complemento à sua superfície, ocorre, instantaneamente, quando essas são administradas por via parenteral, potencializando a sua fagocitose⁷⁶. Uma transposição dessa observação pode ser feita às nanopartículas capazes de permeiar a pele, que, uma vez opsonizadas por anticorpos e fatores do complemento presentes na epiderme e na derme, seriam mais facilmente captadas por macrófagos.

A internalização de alótropos do carbono por macrófagos pode ocorrer através de fagocitose, especialmente quando funcionalizados e agregados^{72; 77}. Embora na maioria dos relatos não tenha sido especificado o termo “pinocitose”, possivelmente os alótropos menores e não agregados permeiam a célula através desse processo.

As investigações sobre a citotoxicidade dos alótropos de carbono em macrófagos são divergentes. Enquanto alguns trabalhos não mostram redução da viabilidade celular⁷⁷, outros descrevem que a toxicidade desses nanomateriais é dependente de sua concentração no meio⁶⁷, da presença de contaminantes metálicos²⁴ e da sua solubilidade⁷⁸. Um ponto divergente entre os estudos, que pode justificar a diferença encontrada, é a concentração do nanomaterial no meio dos experimentos. Trabalho que não observou citotoxicidade utilizou nanopartículas na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ⁷⁷, enquanto nos outros as concentrações variaram de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ^{65;67}. Demonstrou-se também que para essa linhagem celular existe diferença entre o potencial citotóxico de SWCNT e MWCNT, de forma que este último não altera a viabilidade celular, ainda que em grande concentração no meio⁶⁷.

Quanto às alterações funcionais, um estudo demonstrou que apenas os CNT capazes de estimular a fagocitose induziram um aumento de IL-6 e TNF- α , fato não observado com as estruturas que permearam de outra forma a membrana dos macrófagos⁷⁷. A função dos macrófagos perante estímulos habituais, como estruturas bacterianas, também pode ser reduzida após a exposição prévia aos alótropos do carbono. Dumortier et al⁷⁷ demonstraram que esse fato ocorre na dependência da funcionalização utilizada, uma vez que apenas os SWCNT que continham polietileno glicol (PEG), tiveram impacto na função macrofagocítica.

A indução da maturação de macrófagos por esses nanomateriais, estudada através da expressão de moléculas de superfície como CD40 e CD86, mostraram resultados diferentes. Enquanto uma menor concentração de SWCNT no meio não induziu a expressão dessas moléculas⁷⁷, a maturação e ativação de macrófagos foram observadas no trabalho que empregou maior quantidade do nanomaterial⁶⁷. Dessa forma, à semelhança do potencial citotóxico, a ativação do macrófago por CNT e fulerenos pode ser dependente da dose.

Um fenômeno que pode ser observado é a incapacidade de os macrófagos fagocitarem materiais inertes, como os nanomateriais, ainda que estes estejam opsonizados⁷⁶. Esse processo pode levar ao acúmulo de células monocíticas ao redor do nanomaterial, com formação de granulomas⁷⁹, além da liberação de enzimas por células inflamatórias como os neutrófilos, levando ao dano tecidual⁷⁶. Em trabalho em que se estudou a formação de granulomas em pele, SWCNT e MWCNT de 20 e 80 nm foram implantados no subcutâneo de cobaias⁸⁰. A formação granulomatosa foi observada após três semanas do experimento, sendo que tardiamente os SWCNT induziram maior infiltração de macrófagos, deixando os granulomas com paredes mais espessas. A utilização de nanomateriais altamente purificados permitiu a análise de que essas estruturas sozinhas, independentemente de contaminantes metálicos, podem induzir a formação de granulomas (Tabela 1).

Interação com as células dendríticas

A análise da interação de nanomateriais com células dendríticas, as apresentadoras de antígenos mais eficazes do organismo humano, visa principalmente à determinação de uma possível captação, processamento e apresentação de nanomateriais, como se fossem antígenos.

Os alótropos do carbono podem ser internalizados pelas células dendríticas através de macropinocitose⁸¹ e fagocitose^{32;82}, não sendo descrita a endocitose nos trabalhos revistos. A captação parece dependente da concentração do nanomaterial no meio e do tamanho das estruturas, uma vez que aquelas com maior diâmetro são internalizadas mais facilmente⁸².

Os resultados referentes ao potencial citotóxico dos alótropos do carbono são conflitantes. Um trabalho descreve ação tóxica de SWCNT e MWCNT em células dendríticas na dependência da concentração dos nanomateriais no meio (3, 10, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Por sua vez, Wang et al⁸² relataram que MWCNT carboxílicos, de diferentes tamanhos e concentrações (10, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), dotados de contaminantes metálicos, não exerceram atividade citotóxica significativa nessas células. Nota-se que no primeiro trabalho não foram descritas características físico-químicas dos CNT, como a funcionalização, que pudessem justificar as diferenças encontradas. Maior concentração do nanomaterial e a presença de contaminantes metálicos em diferentes quantidades seriam preditores de um maior efeito tóxico, o contrário do que foi observado por Wang et al⁸².

Possível papel imunomodulador de alótropos do carbono em células dendríticas também vem sendo estudado. Através de mecanismos ainda desconhecidos, CNT podem ser conjugados a peptídeos considerados imunógenos fracos, induzindo a internalização por células dendríticas, levando à ativação de linfócitos TCD4+, que por sua vez desenvolvem resposta Th2, com produção de anticorpos⁸¹. Essa propriedade pode ter grande aplicabilidade no desenvolvimento de imunoterapia, especialmente visando ao tratamento de neoplasias, de forma que antígenos do tumor até então considerados fracos imunógenos podem ter seu potencial imune amplificado pela



conjugação com nanomateriais. Por outro lado, existe a possibilidade de se questionar também se os nanomateriais poderiam se ligar a peptídeos autólogos, tornando-os imunógenos fortes, reconhecidos por células apresentadoras de antígenos e propiciando o desenvolvimento de doenças autoimunes.

Quanto à ativação das células dendríticas - um processo essencial para que sejam capazes de apresentar antígenos às células T -, fulerenos e CNT apresentaram resultados diferentes. Os primeiros, segundo Yang et al.⁸³, são capazes de induzir a expressão na superfície das células de moléculas coestimulatórias de linfócitos, receptores de quimiocinas, além de citocinas inflamatórias, efeitos não observados com os CNT^{67;82}. As consequências desses processos devem ser estudadas. Habitualmente, o encontro de antígenos identificados como potencialmente danosos pelas células dendríticas incita o processamento desses e a maturação da célula. Assim, deve ser avaliado se o fulereno pode ser reconhecido como antígeno a ser apresentado às células T ou se interfere apenas em mecanismos de sinalização celular, com efeitos ainda desconhecidos. Além disso, o fato de CNT não ativarem as células dendríticas nos experimentos citados não descarta a possibilidade de esses nanomateriais atuarem como haptenos, ligando-se a peptídeos presentes no meio, passando então a ser considerados imunógenos fortes.

Apesar da relevância das células de Langerhans para a apresentação de antígenos oriundos da pele, no que tange aos alótopos do carbono, não foram encontrados trabalhos que estudassem essa interação. Células dendríticas dérmicas também não são citadas nos estudos encontrados. A importância da reprodução desses achados citados em estudos com pele humana pode ser reforçada pelo observado em trabalhos envolvendo outros nanomateriais aplicados na imunização cutânea. Manolova et al.⁵³ demonstraram que as células apresentadoras de antígenos da pele só seriam relevantes para a captura e transporte de poliestirenos quando estes fossem maiores do que 200 nm. As demais estruturas inferiores a essa medida eram capazes de migrar espontaneamente por linfáticos cutâneos até os linfonodos de drenagem da pele, onde seriam captadas por células dendríticas ali presentes. Dessa forma, se apresentarem o mesmo comportamento, é possível que alótopos do carbono e nanopartículas de prata só venham a interagir com células apresentadoras de antígenos cutâneas, caso se encontrem agregados ou tenham comprimento maior do que 200 nm, no caso de CNT (Tabela 1).

Interação com mastócitos

Os alótopos do carbono podem ser internalizados por mastócitos de pele humana, sendo que trabalho específico com fulerenos mostrou que esse processo ocorre através de endocitose⁸⁴. Já na célula, os fulerenos podem ser encontrados no interior de organelas e livres no citoplasma⁸⁴.

Os estudos indicam haver diferença do impacto dos alótopos do carbono em mastócitos. Enquanto CNT em altas concentrações no meio relacionam-se ao influxo de mastócitos para o sítio de aplicação e aumento da degranulação²⁶, fulerenos

parecem inibir esse processo, além da liberação de citocinas^{85,86}. Esse fato pode ter implicação no emprego desses nanomateriais, uma vez que CNT podem se relacionar a quadros de urticária e angioedema não imunológicos, além de reação anafilactoide, ao tempo que fulerenos podem ser empregados justamente na prevenção dessas reações. A localização dos fulerenos em lisossomas e mitocôndrias, locais da produção de ROS, podem explicar sua ação inibitória sobre mastócitos⁸⁴ (Tabela 1).

Análise da influência de outros fatores na ativação dos mastócitos, como a concentração do nanomaterial no meio e a funcionalização, deve ser mais bem estudada. Ainda que a quantidade de histamina liberada no meio não seja suficiente para a indução de alterações sistêmicas, deve-se lembrar que as substâncias sintetizadas por mastócitos alteram o tônus e a permeabilidade vascular, favorecendo a migração de células inflamatórias para a pele, com consequências diversas.

Interação com eosinófilos

Apesar da participação de eosinófilos em processos alérgicos cutâneos, poucos trabalhos utilizando essas células e alótopos do carbono foram encontrados.

Observou-se que SWCNT, MWCNT e *carbon black* injetados nas vias respiratórias de camundongos, associados a alérgeno ovoalbumina (OVA), são capazes de induzir um aumento de eosinófilos no lavado broncoalveolar⁸⁷. No entanto, não foi relatado aumento de eosinófilos nos experimentos com implante cutâneo de alótopos do carbono (Tabela 1).

A interação com o sistema complemento

Os alótopos do carbono são capazes de se ligar a algumas frações do complemento²⁹ e ativar a via clássica, a via alternativa⁷⁶ e a via das lectinas⁸⁸, embora alguns resultados sejam conflitantes²⁹. Essa ativação do complemento por CNT pode ser reduzida ou inibida através de modificações na superfície do nanomaterial, como a funcionalização por ligações covalentes⁸⁸.

A interação das proteínas do sistema complemento com nanopartículas pode aumentar a depuração dessas estruturas, diminuindo a biodisponibilidade de drogas nanoparticuladas, ou induzir reação pseudoalérgica e anafilactoide, sendo esta última causada por potentes anafilotoxinas como C4a, C3a e C5a.

Apesar da produção de uma diversidade de elementos das vias do complemento por células constituintes da epiderme e derme, e de esses fatores atingirem a pele através da circulação sanguínea, não foram encontrados trabalhos que abordassem a ativação do sistema no local.

Interação dos alótopos do carbono com elementos da resposta imunológica adaptativa

Interações com os linfócitos T

Os CNT funcionalizados são capazes de permear os linfócitos T⁷⁷ e os estudos sobre a citotoxicidade nessas células mos-



taram resultados divergentes^{77,89}, que podem ser justificados por diferenças metodológicas dos experimentos. A funcionalização pode aumentar a citotoxicidade, que é dependente ainda do tempo de exposição e da quantidade de CNT no meio⁸⁹.

Em relação à função linfocitária, os CNT parecem favorecer a ativação de linfócitos T CD4+, em detrimento da célula T CD8+. Koyama et al⁸⁰ implantaram no subcutâneo de camundongos BALB/c, SWCNT (0,8 - 2,2 nm), CSNT (*cup-stacked type carbon nanotubes*) (50-150 nm) e MWCNT (20 e 80 nm) e observaram nas primeiras semanas uma elevação dos linfócitos T CD4+ no sangue periférico e redução da célula T CD8+, na maioria dos experimentos (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo das interações dos alótropos do carbono com células da resposta imunológica adaptativa

Linfócito T	Linfócito B	
Permeação celular	Endocitose?	Endocitose?
Citotoxicidade	- Resultados divergentes; - Solubilidade pode influenciar (Células avaliadas: Balb-c, Jukart)	- SWCNT: não observada (Célula avaliada - Balb-c) - Fulerenos - dependente da concentração (Célula avaliada - Raji)
Alterações funcionais	- Aumento do TCD4+ nos implantes cutâneos - Ativação direta: não observadas - Ativação de macrófagos à Th1 (IFN- γ) - Aumenta resposta a antígenos fracos - Pode induzir resposta Th1 e Th2	- Indução de imunoglobulina contra antígenos fracos - Desenvolvimento de IgG anti-C60 que reage de forma cruzada com C70

Uma vez ativado o linfócito T CD4+, a resposta desenvolvida pode ser tanto do tipo Th1 quanto Th2. Possivelmente, fatores como a funcionalização e outras características dos nanomateriais podem estar envolvidos na determinação da resposta linfocitária. Mais uma vez, essa propriedade imunestimulatória dos alótropos do carbono pode ser aplicada no desenvolvimento de vacinas, potencializando a resposta imunológica contra antígenos fracos.

Deve-se lembrar que a citotoxicidade observada em células T Jukart, comumente utilizadas para estudos de viabilidade de células T, não foi reproduzida em células humanas, levando ao questionamento sobre a utilidade dessa linhagem nos experimentos.

Interação com os linfócitos B e anticorpos

CNT e fulerenos parecem capazes de permear linfócitos B^{78, 91}. Embora SWCNT funcionalizados não ativem e nem mos-

trem atividade citotóxica sobre células B⁷⁷, experimentos com fulerenos evidenciaram citotoxicidade e imunossupressão de linfócitos B^{90,91}. Nesse caso, ressalvas devem ser feitas quanto a variações de concentrações do nanomaterial no meio e à presença da funcionalização.

Outro ponto de interesse no estudo de células B é a capacidade de reconhecerem nanomateriais como antígenos, desencadeando a indesejada produção de anticorpos. Chen et al⁹² demonstraram em seu experimento o desenvolvimento de anticorpos do tipo IgG contra fulerenos C₆₀, com reação cruzada com o C₇₀. Esse achado pode ter impacto tanto no desenvolvimento de vacinas quanto nos riscos relacionados à utilização de alótropos do carbono em fármacos. A indução de IgG direcionada contra nanomateriais pode relacionar-se à diminuição da viabilidade de drogas administradas, bem como associar-se a processos inflamatórios por depósito de imunoglobulinas. Os demais anticorpos presentes no organismo, não específicos para alótropos do carbono, parecem ter interação fraca com esses nanomateriais, não sendo relevantes para o processo de opsonização⁹² (Tabela 2).

Conclusão

O progresso da nanotecnologia depende do desenvolvimento de nanomateriais biocompatíveis e isso envolve o entendimento da interação dessas estruturas com o sistema imunológico.

A divisão entre imunidade inata e adaptativa muitas vezes é difícil devido à interligação existente entre essas duas respostas. A descrição isolada de cada componente da imunidade, apesar de facilitar a avaliação, pode ocultar justamente a interação entre elas.

A interação dos alótropos do carbono com diversos elementos da resposta imunológica inata e adaptativa é ampla e complexa. Pode-se observar que a maioria dos trabalhos citados refere-se a experimentos realizados em camundongos ou *in vitro*, sendo que, neste último caso, utilizaram-se células do sistema imunológico não necessariamente pertencentes à pele humana. Dessa forma, ressalvas devem ser feitas no que tange à transposição dos resultados observados para a pele, uma vez que interações imunes em sistemas vivos podem modificar respostas observadas em experimentos *in vitro*.

Apesar da relevância para a avaliação de propriedades biológicas, não se observa padronização da descrição mínima de características físico-químicas dos nanomateriais empregados nos experimentos. Essa carência, associada às diferenças de técnicas, pode dificultar a interpretação de dados conflitantes observados.

De uma forma geral, os alótropos de carbono potencialmente podem estar envolvidos em reações irritativas e granulomatosas na pele, além de angioedema, urticária e reação anafilactoide. Novos estudos são necessários para o estabelecimento dos riscos e benefícios advindos das interações de nanomateriais com o sistema imunológico cutâneo.



Agradecimentos

Este trabalho representa parte dos resultados da dissertação de mestrado de Ana Luiza Castro Fernandes, ex-bolsista da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O artigo se inclui entre os produtos do projeto de Processo 936/2009, financiado pela CAPES.

Referências

- Cao G, Wang Y. Introduction. In: Cao G, Wang Y. (editores). *Nanostructures and Nanomaterials: synthesis, properties, and applications*. 2. ed. London: Imperial College Press; 2004. p.1-17.
- Nel A, Xia T, Madler L, Ning L. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-7.
- Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2007;115(8):1125-31.
- Quaresma A. Introdução. In: Quaresma A. (editor). *Nanotecnologias: Zênite ou Nadir?* Rio de Janeiro: Escriba; 2010. p.17-22.
- Aschberger K, Johnston HJ, Stone V, Aitken RJ, Tran CL, Hankin SM, Peters SA, Christensen FM. Review of fullerene toxicity and exposure: appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;58(3):455-73.
- Streilein JW. Skin-associated lymphoid-tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol*. 1983;80 Suppl:12s-16s.
- Babiuk S, Baca-Estrada M, Babiuk LA, Ewen C, Foldvari M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *J Control Release*. 2000;66(2-3):199-214.
- Zhu Y, Kuhn T, Mayo P, Hinds WC. Comparison of daytime and nighttime concentration profiles and size distributions of ultrafine particles near a major highway. *Environ Sci Technol*. 2006;40(8):2531-6.
- The European Commission, The Scientific Committee on Consumer Products. Preliminary opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products [Internet]. Brussels: European Commission; 2007. [acesso em 28 nov. 2013]. Disponível em: <http://nanotech.law.asu.edu/?org=25>.
- Nasir A, Friedman A. Nanotechnology and the Nanodermatology Society. *J Drugs Dermatol*. 2010;9(7):879-82.
- Armfield M A. Carbon allotropes: the same & not the same. Project Teaching Methods [Internet]. Evanston, IL: Northwestern University; 2005 [acesso em 12 jul. 2011]. Disponível em: <http://www.nsec.northwestern.edu/Curriculum%20Projects/Carbon%20Allotropes.pdf>
- Baowan D, Cox BJ, Hill JM. Instability of C₆₀ fullerene interacting with lipid bilayer. *J Mol Model*. 2012;18(2):549-57.
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6(3):591-9.
- Fujimoto T, Aoshima H, Kokubo K, Ito M, Niwa N. Antioxidant property of fullerene is effective in skin whitening. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(3):AB54.
- Xiao L, Takada H, Gan Xh, Miwa N. The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(6):1590-5.
- Jovanovic B, Anastasova L, Rowe EW, Palić D. Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (*Pimephales promelas Rafinesque, 1820*). *Aquat Toxicol*. 2011 Jan 25;101(2):474-82.
- Inui S, Aoshima H, Nishiyama A, Itami S. Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: unique impact on skin care. *Nanomedicine*. 2011;7(2):238-41.
- Fumelli C, Marconi A, Salvioli S, Straface E, Malorni W, Offidani AM, Pellicciari R, Schettini G, Giannetti A, Monti D, Franceschi C, Pincelli C. Carboxyfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2000;115(5):835-41.
- Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Biological safety of LipoFullerene composed of squalane and fullerene-C60 upon mutagenesis, photocytotoxicity, and permeability into the human skin tissue. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104(6):483-7.
- Xiao L, Matsubayashi K, Miwa N. Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(5-6):245-57.
- Thostenson ET, Ren ZF, Chou TW. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*. 2001;61(13):1899-912.
- International Organization for Standardization. ISO/TS 80004-3: Nanotechnologies - Vocabulary - Part 3: Carbon nano-objects. Geneva, 2010. [acesso em 28 de nov de 2013]. Disponível em: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=50741.
- Rybak-Smith MJ, Sim RB. Complement activation by carbon nanotubes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(12):1031-41.
- Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Mercer R, Castranova V, Shvedova AA. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicol Lett*. 2006;165(1):88-100.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66(20):1909-26.
- Murray AR, Kisin E, Leonard SS, Young SH, Kommineni C, Kagan VE, Castranova V, Shvedova AA. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*. 2009;257(3):161-71.



27. Kayat J, Gajbhiye V, Tekade RK, Jain NK. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report. *Nanomedicine*. 2011;7(1):40-9.
28. Muller J, Huaux F, Fonseca A, Nagy JB, Moreau N, Delos M, Raymundo-Piñero E, Béguin F, Kirsch-Volders M, Fenoglio I, Fubini B, Lison D. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1698-705.
29. Ling WL, Biro A, Bally I, Tacnet P, Deniaud A, Doris E, Frachet P, Schoehn G, Pebay-Peyroula E, Arlaud GJ. Proteins of the innate immune system crystallize on carbon nanotubes but are not activated. *ACS Nano*. 2011;5(2):730-7.
30. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;61(3):276-81.
31. Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, Kam NW, Shim M, Li Y, Kim W, Utz PJ, Dai H. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):4984-9.
32. Yang R, Yang X, Zhang Z, Zhang Y, Wang S, Cai Z, Jia Y, Ma Y, Zheng C, Lu Y, Roden R, Chen Y. Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells. *Gene Ther*. 2006;13(24):1714-23.
33. Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol*. 2003;10(10):961-6.
34. Liu Z, Winters M, Holodniy M, Dai H. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(12):2023-7.
35. Rybak-Smith MJ, Sim RB. Complement activation by carbon nanotubes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(12):1031-41.
36. Rouse JG, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology in Vitro*. 2006;20:1313-20.
37. Gao J, Wang HL, Iyer R. Suppression of proinflammatory cytokines in functionalized fullerene-exposed dermal keratinocytes [Internet]. *J Nanomater*. 2010;1-9. [acesso em 15 jun. 2013]. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2010/416408/>
38. Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol*. 2003;10(10):961-6.
39. Baroli B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *J Pharm Sci*. 2010;99(1):21-50.
40. Chu DH. Overview of Biology, Development and Structure of Skin. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz S, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ (Ed.). *Fitzpatrick's - Dermatology in General Medicine*. 7. ed. EUA: Mc Graw Hill, v.1, 2008. cap. 7, p.57-72.
41. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EM, Yoong C, Robertson TA, Soyer HP, Roberts MS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):470-91.
42. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*. 2007;29(1):3-14.
43. Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, de Jong EC. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*. 2007;127(2):331-41.
44. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadekaro AL, Hershkovitz D, Peters E, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z, Takeda K, Paus R, Ortonne JP, Hearing VJ, Schallreuter KU. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol*. 2009;18(9):799-819.
45. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;88(1-2):1-12.
46. Australian Government. Department of Health and Ageing. A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens [Internet]. Australia; 2009. [acesso em 15 nov. 2013]. Disponível em: <http://www.tga.gov.au/pdf/archive/sunscreens-nanoparticles-2009.pdf>.
47. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*. 2000;9(3):165-9.
48. Lima HC. Interação celular na resposta imunológica. In: Lima HC. (editor). *Tópicos em Imunodermatologia Clínica*. São Paulo: Segmento Farma; 2004. p. 21-41.
49. Abbas AK. Imunidade Natural. In: Abbas A, Lichtman AH, Pillai S (editores). *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008, p.19-46.
50. Spellberg B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci*. 2000;67(5):477-502.
51. Weber-Matthiesen K, Sterry W. Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol*. 1990;95(1):83-9.
52. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-61.
53. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol*. 2008;38(5):1404-13.
54. Buentke E, Heffler LC, Wilson JL, Wallin RP, Löfman C, Chambers BJ, Ljunggren HG, Scheynius A. Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--Malassezia-influenced cell interaction. *J Invest Dermatol*. 2002;119(4):850-7.
55. Bodey B, Bodey B Jr, Kaiser HE. Dendritic type, accessory cells within the mammalian thymic microenvironment. Antigen presentation in the dendritic neuro-endocrine-immune cellular network. *In Vivo*. 1997;11(4):351-70.
56. Abbas AK. Hipersensibilidade Imediata. In: Abbas A, Lichtman AH, Pillai S (editores). *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 441-61.



57. Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):298-310.
58. Leiferman K, Peters M. Eosinophils in Cutaneous Diseases. In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrist B, Paller A, Leffell DJ (editores). *Fitzpatrick: Dermatology in General Medicine*. 7. ed. Washington: MG Graw Hill Medical; 2008. p. 307-18.
59. Timár KK, Dallos A, Kiss M, Husz S, Bos JD, Asghar SS. Expression of terminal complement components by human keratinocytes. *Mol Immunol*. 2007;44(10):2578-86.
60. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, Van Der Loos CM, Kapfenberg ML. The skin immune-system (SIS) - distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human-skin. *J Invest Dermatol*. 1987;88(5):569-73.
61. Santamaria-Babi LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol*. 2004;14(1):13-8.
62. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*. 2005;155(3):377-84.
63. Bullarddillard R, Creek KE, Scrivens WA, Tour JM. Tissue sites of uptake of C-14-labeled C-60. *Bioorg Chem*. 1996;24(4):376-85.
64. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*. 2010;145(3):182-95.
65. Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett*. 2005;5(12):2448-64.
66. Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter. *Langmuir*. 2008;24(13):6409-13.
67. Palomäki J, Karisola P, Pyllkkänen L, Savolainen K, Aelenius H. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*. 2010;267:125-31.
68. Amado A, Taylor J, Sood A. Irritant Contact Dermatitis. In: Modlin R L, Kim J. (editores). *Fitzpatrick: Dermatology in General Medicine*. 7. ed. Washington: Mc Graw Hill Medical; 2008. p.395-400.
69. Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett*. 2007;7(1):155-60.
70. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C(60)) topically exposed in industrial organic solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;242(1):29-37.
71. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineneni C, Castranova V, Fadeel B, Kagan VE. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;231(2):235-40.
72. Kagan VE, Konduru NV, Feng W, Allen BL, Conroy J, Volkov Y, Vlasova II, Belikova NA, Yanamala N, Kapralov A, Tyurina YY, Shi J, Kisin ER, Murray AR, Franks J, Stolz D, Gou P, Klein-Seetharaman J, Fadeel B, Star A, Shvedova AA. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(5):354-9.
73. Tsao N, Luh TY, Chou CK, Wu JJ, Lin YS, Lei HY. Inhibition of group A streptococcus infection by carboxyfullerene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1788-93.
74. Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Murakami M, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Shinohara N, Nakanishi J, Tanaka I. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:4.
75. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*. 2008;5(4):487-95.
76. Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green ML, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol*. 2006;43(3):193-201.
77. Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand JP, Prato M, Muller S, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett*. 2006;6(7):1522-8.
78. Chun YW, Wang W, Choi J, Nam TH, Lee YH, Cho KK, Im YM, Kim M, Gwon YH, Kang SS, Lee JD, Lee K, Khang D, Webster TJ. Control of macrophage responses on hydrophobic and hydrophilic carbon nanostructures. *Carbon*. 2011;49(6):2092-103.
79. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5):L698-708.
80. Koyama S, Endo M, Kim Y -A, Hayashi T, Yanagisawa T, Osaka K, Koyama K, Haniu H, Kuroiwa N. Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon*. 2006;44(6):1079-92.
81. Villa CH, Dao T, Ahearn I, Fehrenbacher N, Casey E, Rey DA, Korontsvit T, Zakhaleva V, Batt CA, Phillips MR, Scheinberg DA. Single-walled carbon nanotubes deliver peptide antigen into dendritic cells and enhance IgG responses to tumor-associated antigens. *ACS Nano*. 2011;5(7):5300-11.
82. Wang J, Sun RH, Zhang N, Nie H, Liu J-H, Wang JN, H Wang, Y Liu. Multi-walled carbon nanotubes do not impair immune functions of dendritic cells. *Carbon*. 2009; 47(7):1752-60.
83. Yang D, Zhao Y, Guo H, Li Y, Tewary P, Xing G, Hou W, Oppenheim JJ, Zhang N. [Gd@C(82)(OH)(22)](n) nanoparticles



- induce dendritic cell maturation and activate Th1 immune responses. *ACS Nano*. 2010;4(2):1178-86.
84. Dellinger A, Zhou Z, Norton SK, Lenk R, Conrad D, Kepley CL. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine*. 2010;6(4):575-82.
85. Dellinger AL, Brooks B, Zhou Z, Lenk R, Macfarland D, Kepley C. Fullerene Structure Regulates Fce RI-Calcium Flux in Human Mast Cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):AB182.
86. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W, Schwartz LB, Lenk R, Kepley CL. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol*. 2007;179(1):665-72.
87. Nygaard UC, Hansen JS, Samuelsen M, Alberg T, Marioara CD, Løvik M. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol Sci*. 2009;109(1):113-23.
88. Moghimi SM, Andersen AJ, Hashemi SH, Lettiero B, Ahmadvand D, Hunter AC, Andresen TL, Hamad I, Szebeni J. Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: the challenges ahead. *J Control Release*. 2010;146(2):175-81.
89. Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):121-6.
90. Irie K, Nakamura Y, Ohigashi H, Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E. Photocytotoxicity of water-soluble fullerene derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996;60(8):1359-61.
91. Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Markovic ZM, Milonjic SK, Trajkovic VS. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C(60)) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immunosuppression in the cancer-promoting activity of C(60). *Biomaterials*. 2009;30(36):6940-6.
92. Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF. Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10809-13.

Data de recebimento: 03/09/2013

Data de aceite: 27/11/2013