

UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOÃO VICTOR BRANDÃO QUITIBA

Ação de gemcitabina e paclitaxel transportado por nanocarreadores lipídicos para modulação
de células tumorais e imunocompetentes

São Carlos

2021

JOÃO VICTOR BRANDÃO QUITIBA

Ação de gemcitabina e paclitaxel transportado por nanocarreadores lipídicos para modulação de células tumorais e imunocompetentes

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Bacharel em Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Quitiba, João Victor Brandão

Ação de gemcitabina e paclitaxel transportado por nanocarreadores lipídicos para modulação de células tumorais e imunocompetentes / João Victor Brandão Quitiba; orientador Valtencir Zucolotto -- São Carlos, 2021.

28 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Nanomedicina. 2. Imuno. 3. Câncer. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

RESUMO

QUITIBA, J.V. B. **Ação de gemcitabina e paclitaxel transportado por nanocarreadores lipídicos para modulação de células tumorais e imunocompetentes.** 2021. 28p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

O câncer é uma das doenças crônicas mais recorrentes na população brasileira e mundial. Neste cenário, o carcinoma pancreático humano está entre as neoplasias com maior número de mortes no mundo e a elevada frequência de casos de recidivas e metástases demandam o desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para aumentar a atividade dos principais mecanismos efetores da imunidade celular. Como um dos principais fatores que favorece o crescimento e a expansão das células neoplásicas é sua capacidade de modular o microambiente tumoral e evadir-se da imunovigilância, o presente projeto foi formulado para desenvolver nanocarreadores para o transporte de agentes antineoplásicos para o interior de células tumorais e modulação das principais células do sistema imune. Com esse propósito, nanopartículas lipídicas foram sintetizadas com os principais componentes da membrana plasmática da célula tumoral e incorporadas com gemcitabina e paclitaxel (drogas de primeira linha utilizada no tratamento clínico), visando o endereçamento dos carreadores para as células tumorais e a entrega de material antigênico a monócitos. Assim, o presente projeto visa contribuir para o desenvolvimento de um nanocarreador para o transporte de agentes imunomoduladores, tanto para o interior de células tumorais, quanto para células imunocompetentes. Como resultados esperados, visamos aumentar a imunogenicidade das células tumorais e de modular positivamente a ação de células apresentadoras de antígenos.

Palavras-chave: Nanomedicina. Imuno. Câncer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	11
2.1	Síntese das nanopartículas	11
2.2	Incorporação de gemcitabina e paclitaxel as MNPs	11
2.3	Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-VIS)	11
2.4	Análise de nanopartículas (NTA) e potencial zeta	11
2.5	Cultura de células tumorais.	11
2.6	Ensaio de citotoxicidade (MTT).	12
2.7	Marcação da MNPs com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células.	12
2.8	Incorporação de MNPs por células de câncer pancreático e células mononucleares.	12
2.9	Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo.	12
2.10	Análise estatística.	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1	Construção das nanopartículas de membrana	15
3.2	Caracterização Físico-Química	15
3.3	Análises de Citotoxicidade	17
3.4	Análises de Citotoxicidade de diferentes proporções de MNP-GEM e MNP-PTX	19
3.5	Interação de nanopartículas com células tumorais e monócitos	21
3.6	Morte celular induzida por apoptose e / ou necrose.	23
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por 15% das mortes no mundo (1) e fatores como alimentação, envelhecimento e aumento da população mundial contribuem na incidência dessa doença crônica. (2) Em 2018, foram registrados 9,5 milhões de mortes em decorrência dessa doença e 18 milhões de novos casos foram registrados. (2) Dentre eles, o câncer de pâncreas é classificado como a 14ª neoplasia de maior frequência e a 7ª maior causa de mortalidade. Seus principais sintomas se manifestam quando a doença se encontra em estágios avançados no organismo, com o diagnóstico sendo confirmado tardiamente. (2) A cirurgia é a principal medida terapêutica que, acompanhada de tratamento quimioterápico, contribuem para a sobrevivência dos pacientes. (3-4)

Na quimioterapia, as classes de drogas mais comuns incluem agentes alquilantes para inibir a transcrição de DNA, antimetabólitos como análogo de compostos celulares para bloqueio de vias metabólicas na fase S, agentes direcionadores de microtúbulos para destruir ou estabilizar o citoesqueleto na fase G0/G1 e/ou G2/M, inibidores de topoisomerase e antraciclina. (5) A longo prazo, as células de carcinoma pancreático apresentam alta resistência aos quimioterápicos. (6) A fim de melhorar a eficácia dos tratamentos, estudos verificaram os efeitos da combinação de gemcitabina (GEM) com outras classes de drogas, como cisplatina, oxaliplatina, taxois e capecitabina. Porém, testes em humanos demonstram que apenas os grupos tratados com a combinação GEM + taxol apresentam efeitos superiores à monoterapia com gemcitabina em ensaios clínicos de fase III. (7)

Limitações dessa técnica terapêutica, como falta de especificidade e eficácia constante, são superadas utilizando as propriedades físico-químicas de nanocompósitos, potencializando a citotoxicidade dos agentes terapêuticos sem observar desregulação metabólica provocada pela síndrome de lise tumoral. Estudos extensivos têm sido aplicados para fornecer alta concentração de drogas dentro das células-alvo e minimizar a toxicidade indesejável a outros tecidos. As nanopartículas podem ser usadas para transportar agentes antineoplásicos, como proteínas, ácidos nucleicos e drogas, melhorando sua ação nas células de interesse. A aplicabilidade dessas partículas depende de seu tamanho que determina sua capacidade de movimento no interior dos órgãos e tecidos. (8) O “endereço” para sítios primários e metastáticos pode ser feito através de técnicas de mimetização de sua superfície, estabelecendo maior especificidade para o tecido alvo. (9) Os quimioterápicos adsorvidos ou ligados covalentemente nos nanomateriais podem inibir a expulsão do fármaco do citoplasma por proteínas transportadoras de ATP (transportadores ABC). (10) Tal peculiaridade aumenta a liberação de drogas hidrofóbicas e minimiza a baixa biodisponibilidade após o encapsulamento na superfície das NPs e/ou dentro

do sistema. A administração simultânea de GEM e PTX (que apresentam mecanismos de ação distintas nas células) aumenta a sobrevida de pacientes com câncer pancreático metastático em pelo menos 2 meses, em comparação com aplicação de somente gemcitabina. (11) Assim, a combinação de gemcitabina e taxois pode ser considerada como um novo recurso terapêutico para o tratamento de câncer pancreático.

Estudos recentes demonstraram que a aplicação de doses baixas e ultrabaixas inibem os efeitos colaterais negativos, como imunossupressão severa e desenvolvimento de quimiorresistência, que selecionam e restaura o crescimento neoplásico. (12) Essa nova técnica terapêutica está se tornando mais atraente, pois doses baixas de quimioterápicos possuem propriedades anti-angiogênicas e reduzem a inibição de macrófagos e linfócitos no sítio tumoral, permitindo que as células do organismo apresentem maior eficácia contra as neoplasias. (13) Também já foi demonstrado que a concentração baixa de fármaco no microambiente tumoral diminui a recidiva do câncer de forma mais eficaz do que a aplicação periódica da dose máxima tolerada. (13-15)

Um avanço recente na nanoengenharia utiliza os principais componentes da membrana celular para camuflar as nanoestruturas nos organismos. (16) Lipídios e proteínas são isolados por ultracentrifugação e depositados na superfície das partículas por forças mecânicas ou utilizadas na síntese de nanovesículas para a entrega de grande quantidade de material antigênico as células apresentadoras de antígenos (APCs). A presença de proteínas de adesão celular facilita a interação com populações específicas (16-17) e os lipídios da membrana (fosfolipídios, glicolipídios e colesterol) aumentam a estabilidade em meio biológico, mantendo a disponibilidade do fármaco por semanas no sistema circulatório. (18-20)

Considerando que nanocarreadores podem carrear simultaneamente mais de um agente quimioterápico tanto para células tumorais quanto para células imunocompetentes, sintetizaremos nanopartículas lipídicas com os principais componentes da membrana de células pancreática (CAPAN-1) conjugada com dois fármacos de primeira linha (GEM e paclitaxel - PTX). Estudos recentes demonstram que a ação da GEM é potencializada na presença de baixas doses de PTX. Tal combinação reduz a concentração efetiva mínima dos quimioterápicos e seus efeitos colaterais nas células saudáveis. Pois, quando incorporadas em uma nanoestrutura lipídica de carga positiva, o sistema previne a redução do pH nos fagolisossomas (pH 4,8) e a degradação do fármaco. As nanopartículas lipídicas são responsáveis por reduzir a toxicidade hematológica e vascular, normalmente observada em tratamentos clínicos com quimioterápicos puros, restaurando o nível normal de plaquetas, monócitos e células T no sangue. (21-22)

Nesse cenário, áreas como nanomedicina e imunoterapia têm os resultados clínicos mais satisfatórios. Atualmente, estudos que englobam seu conhecimento criam novas modalidades de terapias capazes de reduzir a expansão das células doentes e os efeitos adversos dos tratamentos. (23) Nossos resultados preliminares indicam excelente estabilidade de nanovesícula sintetizadas da linhagem celular PANC-1 e maiores efeitos citotóxicos da nanopartícula carreando GEM/PTX do que apenas GEM ou a combinação de GEM/PTX sozinhos, indicando que a nanopartícula da membrana favorece a interação com as células tumorais. Esses achados interessantes favorecem a incorporação de adjuvantes imunológicos e a liberação de material antigênico para células imunes humanas, como monócitos, células dendríticas e linfócitos de doadores de saúde.

Para testar a especificidade os nanocarreadores serão expostos às células PANC-1 (tumor pancreático humano) e células HEPA-RG (linhagem celular hepática de fenótipo saudável). A adesão/internalização será analisada através de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo e a atividade citotóxica da droga imobilizada será testada por exposição *in vitro* de células tumorais—alvo aos nanocarreadores e posterior análise da capacidade de redução de metil tetrazólio (MTT) e citometria de fluxo.

Assim, as nanopartículas serão testadas *in vitro* quanto: a) a especificidade para células tumorais; b) internalização das partículas pelas células tumorais, monócitos e c) a atividade citotóxica do Gemcitabina/paclitaxel imobilizado nos nanocarreadores.

2 METODOLOGIA

2.1 Síntese das nanopartículas

Membranas de células de carcinoma pancreático foram isoladas e purificadas por ultracentrifugação, seguindo a metodologia proposta por Lung *et al* (24) e reconstruídas como vesículas por extrusão. Resumidamente, as células foram descoladas de garrafas de cultura e lavadas três vezes, por centrifugação, com PBS e lisadas por incubação em tampão hipotônico durante 20 min a 4°C. As células lisadas foram centrifugadas, ressuspensas em tampão e homogeneizadas, seguido de centrifugação a 15.000 g durante 15 min a 4°C para remover os detritos celulares. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 100.000 g durante 2h utilizando uma ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, EUA) a 4°C. O pellet, com as membranas, foi disperso em 1 ml de PBS contendo Inibidor de Protease Completo (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e armazenado a -80°C.

2.2 Incorporação de gemcitabina e paclitaxel as MNPs

A incorporação de gemcitabina (GEM) e paclitaxel (PTX) as MNPs (MNPs-GEM e MNPs-PTX) foi preparada misturando 1 ml da suspensão de MNPs a 10^9 partícula/ml com 5.2 µl de GEM a 100 uM e 7.12 µl de PTX a 5 nM dissolvida em PBS e submetida à extrusão por uma membrana de 100 nm em um nano-extruder Malvern à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 100000 g durante 2h e lavada com PBS. Após a remoção da GEM e PTX não conjugado, o complexo MNPs-GEM e MNPs-PTX foi ressuspensão em 1 ml de PBS sob sonicação suave por 30 min. a 40 kHz.

2.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

Espectroscopia no UV-VIS-NIR foi utilizada para acompanhar a cinética de formação das nanopartículas e estimar a quantidade de quimioterápico conjugado na MNPs (espectrofotômetro Hitachi, modelo U2008).

2.4 Análise de nanopartículas (NTA) e potencial zeta

Utilizando os equipamentos Malvern NanoSightNS300 e spectrometer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) foi realizado medidas de distribuição de tamanho, concentração e potencial zeta dos nanomateriais em suspensão, a fim de se obter informações sobre polidispersividade e potencial de superfície.

2.5 Cultura de células tumorais.

As células linhagem celular de câncer de pâncreas humano (PANC-1) foi cultivada em meio completo [meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e HEPES (Sigma), 1% de antibiótico e antimicóticos (Life Technologies)] a 37°C e sob tensão de 5% de CO₂, até completarem a

monocamada, sendo então soltas da superfície utilizando tripsina-EDTA (Gibco) 0,05% e lavadas em meio de cultura completo para uso nos ensaios.

2.6 Ensaio de citotoxicidade (MTT).

Como primeira análise de interação das nanopartículas com as células, avaliamos seu efeito sobre a viabilidade de células tumorais (PANC-1) 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 fundo chato por 24 e 48h. Como contrastes, foram testados: a) MNPs puro; b) MNPs conjugado com GEM (MNPs-GEM); c) MNPs com PTX (MNPs-PTX) e d) apenas GEM e 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 3h a 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 dimetilsulfóxido (DMSO), para posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

2.7 Marcação da MNPs com isotiocianato de fluoresceína e análise de interação com células.

Para marcação fluorescente 10^9 partículas foram dispersas em 1 mL de PBS adicionando-se, em seguida, 0.1 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC). A mistura foi agitada no escuro a 4°C durante 12h. Para separar o complexo MNPs-FITC da fluoresceína não conjugada, a solução de nanopartícula foi submetida a uma diálise de 12h em uma membrana de 12 kDa. No final, a suspensão foi recuperada por centrifugação e preparada com PBS. Essas nanopartículas fluoro marcadas foram utilizadas apenas para verificar a incorporação das MNPs por células mononucleares (monócitos) e células de câncer pancreático (PANC-1).

2.8 Incorporação de MNPs por células de câncer pancreático e células mononucleares.

As células foram expostas a uma solução de 10^9 partículas/ml de MNPs-FITC durante 48h. Os resultados adquiridos em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur foram analisados utilizando o software FlowJo, versão vX. 10.6.

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

A atividade citotóxica será confirmada por citometria de fluxo, utilizando-se a concentração de 10^8 partículas por ml de MNPs com 10 uM de GEM e 10 nM de PTX para cada

1×10^5 células. Para isso cultura de células tumorais serão plaqueadas em placas de 12 poços e aplicadas os tratamentos.

Após 48h de incubação, o sobrenadante será removido e as partículas em suspensão, bem como restos celulares, serão removidos por lavagem delicada dos alvéolos com meio de cultura à 37°C. Cerca de 1×10^5 células serão recolhidas em eppendorfs e centrifugadas a 10000 rpm por 30 segundos e ressuspensas em isotom (PBS, contendo 0,5 % de BSA) e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com Anexina V. Decorrido o tempo de incubação, as células serão recolhidas em tubos de citometria e marcadas com 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, esse produto marcado com PerCP, cuja intensidade de fluorescência é identificada em outros comprimentos de onda. Esse produto mostra em células que sofrem lise osmótica através dos poros formados na superfície. 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 serão: a) MNPs; b) MNPs carregado com GEM e com PTX e c) apenas GEM e PTX em concentração equivalente.

2.10 Análise estatística.

Todos os ensaios funcionais foram repetidos pelo menos 3 vezes. Os ensaios que envolveram células de sangue periférico foram realizados com material biológico de 3 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% (0.05).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Construção das nanopartículas de membrana

No presente estudo, investigamos uma classe de nanoestrutura para transportar gemcitabina e paclitaxel, testando sua eficácia em células cancerígenas pancreáticas, delimitando a dose adequada para futuros ensaios em linhagens de células saudáveis, tais como células imunocompetentes. Para incorporar os agentes antineoplásicos nas nanopartículas, a membrana foi extrudada através de uma membrana de policarbonato de 100 nm com as moléculas quimioterapêuticas. Após a síntese, foram realizadas caracterizações físico-químicas para analisar as diferenças na estrutura dos nanocarreadores.

3.2 Caracterização Físico-Química

Para determinar o tamanho e carga superficial das estruturas em solução salina (PBS a pH 7,4), bem como estimar a concentrações de nanopartículas nas amostras, utilizamos Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) e Zetasizer Nano ZS (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho de partículas e potencial zeta com base nos dados NTA e Zetasizer Nano ZS.

Nanopartículas	Tamanho (nm) NTA	Potencial Zeta $\zeta(mV)$
MNP	$147,2 \pm 0,8$	$-5,6 \pm 0,5$
MNP-GEM	$150,0 \pm 0,5$	-7 ± 2
MNP-PTX	139 ± 1	-5 ± 3

Fonte: Elaborada pelo autor

As nanopartículas apresentaram maior raio hidrodinâmico após a exposição ao meio de cultura celular, com adsorção de proteínas criando uma corona proteica na superfície. Podemos verificar a deposição de proteínas nas nanopartículas pela redução do potencial zeta quando comparado com solução salina (pH 7,4). Para futuros estudos, é importante verificar a estabilidade dessas estruturas e analisar fenômenos de agregação durante um período médio de 48 horas. Nossos resultados não observaram variações drásticas no tamanho e carga superficial, demonstrando boa monodispersividade em solução.

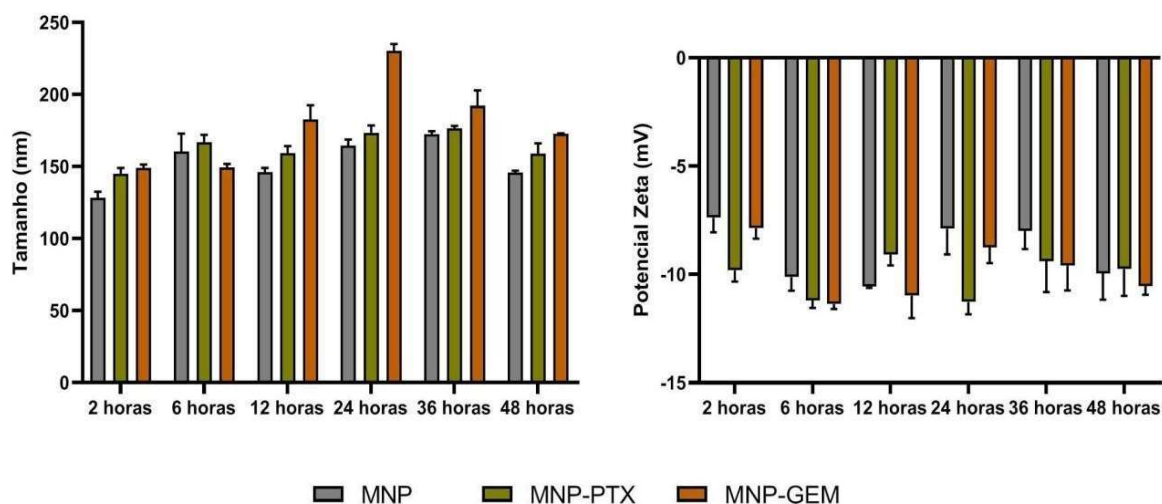


Figura 1: Tamanho (A) e potencial zeta (B) dos MNPs, MNPs-PTX e MNPs-GEM a 2, 6, 12, 24, 36 e 48 horas com DMEM 10% de FBS.

Fonte: Elaborada pelo autor

O revestimento das nanopartículas com proteínas da superfície celular contribuem para aumentar a dispersividade em soluções aquosas, ajudando em sua estabilidade e facilitando a conjugação de substâncias adicionais dentro de sua estrutura. (18-20) Nanovesículas sintetizadas com os principais componentes da membrana plasmática da célula PANC-1 mantém em sua estrutura moléculas de adesão aos receptores de células neoplásicas.

Também realizamos microscopia de força atômica (AFM) a fim de analisar a morfologia das nanopartículas derivadas da membrana plasmática de linhagem celular de câncer de pâncreas (PANC-1). A análise por AFM revelou nanopartículas lipídicas com tamanho médio entre 100-200 nm, comprovando o resultado encontrado no NTA (Figura 2).

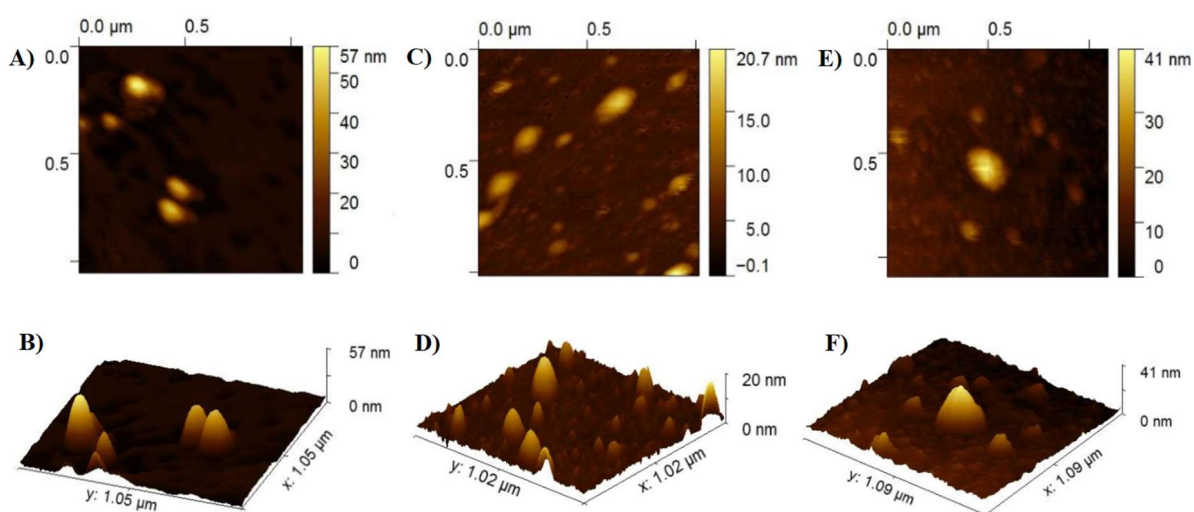


Figura 2: Reconstrução da imagem do eixo Z e imagem tridimensional das nanopartículas da membrana plasmática (MNPs). (A, B) MNPs (C, D) MNPs-PTX (E, F) MNPs-GEM.

Fonte: Elaborada pelo autor

A microscopia de força atômica e os resultados de NTA revelaram ausência de alterações estruturais nas nanopartículas após a conjugação com os quimioterapêuticos, com tamanho entre 100 nm e 200 nm. A carga superficial das nanoestruturas demonstrou ser negativa em todos os grupos experimentais (MNPs, MNPs-PTX e MNPs-GEM) e quando dispersada em meio de cultura observamos redução nesse valor com excelente estabilidade após 48h de análise.

A incorporação de agentes quimioterapêuticos nas MNPs foi estimada usando espectroscopia UV/Visível pela lei de Beer-Lambert, examinando os espectros de absorção de MNPs pura, MNPs-GEM, MNPs-PTX, GEM pura e PTX puro (Figura 3.A) em diferentes concentrações. A liberação do fármaco foi investigada em PBS (pH 7,4) e a concentração determinada usando curvas padrão GEM (Figura 3.B). A partir desses resultados foi comprovada a incorporação de aproximadamente 6,5 μM de GEM em 1×10^9 partículas/ml de MNPs. Devido ao espectro de absorção do PTX ser baixo e estar na mesma faixa das MNPs não foi possível verificar a quantidade de PTX na amostra.

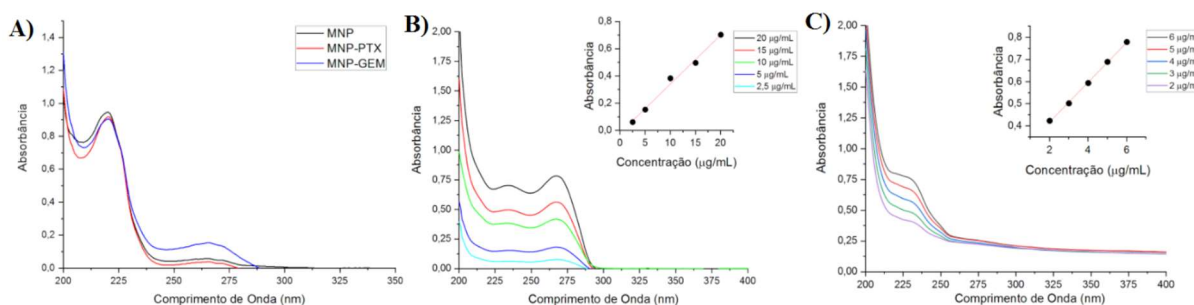


Figura 3: Espectro de absorbância de MNPs, MNPs-PTX, MNP-GEM (A) para 1×10^9 partículas/ml e GEM e PTX (B, C) em diferentes concentrações. Pelos valores de absorbância, suas respectivas curvas padrão ajudaram a estimar a concentração de MNPs-GEM quando conjugadas.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3 Análises de Citotoxicidade

Realizamos o ensaio colorimétrico de metil tetrazólio (MTT), a fim de avaliar a toxicidade das MNPs e determinar sua concentração a ser usada em ensaios futuros. As MNPs na ausência dos quimioterápicos não exibem toxicidade após 24h e 48h (Figura 4.A). Na concentração de 1×10^9 partículas/ml, as MNPs-GEM reduziram a viabilidade das células tumorais em 25% após 24h de incubação, enquanto que no período de 48h observamos aumento na toxicidade para 35% (Figura 4.B). Nanopartículas conjugadas com PTX revelaram viabilidade celular entre 60% após 24h, mas a baixa concentração de PTX permitiu que células tumorais retomassem o crescimento após 48h (80% de viabilidade) (Figura 4.C). Consequentemente, optamos por trabalhar com 1×10^9 partículas/ml em testes futuros com células cancerígenas e células sanguíneas periféricas saudáveis.

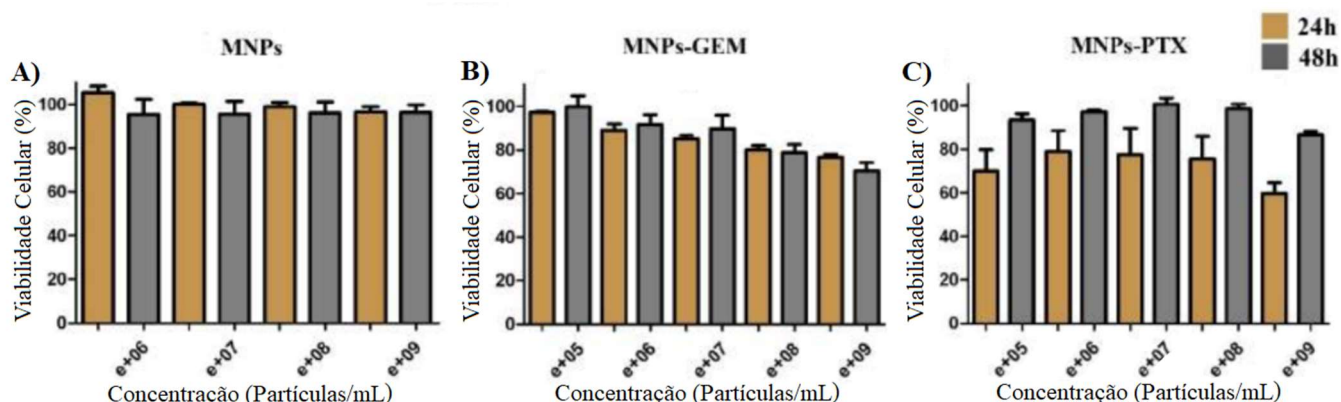


Figura 4: Análise de citotoxicidade de MNPs em células de câncer de pâncreas (PANC-1) por redução de metil tetrazólio (MTT). PANC-1 (1×10^5 células por poço) foi exposta a A) MNPs puros, B) gemcitabina conjugada em MNPs (MNPs-GEM) e C) paclitaxel em MNPs (MNPs-PTX) para verificar sua resposta e estimar a concentração de trabalho em células de carcinoma pancreático.

Fonte: Elaborada pelo autor

Realizou-se o ensaio de MTT para a gemcitabina pura (GEM) e gemcitabina aliada a paclitaxel (PTX) puros para verificar a eficácia da conjugação desses dois quimioterápicos (Figura 5). Observamos um ligeiro aumento da eficácia da GEM combinada com PTX após 48 horas de tratamento. O próximo passo investigaremos a eficiência da combinação de MNPs-GEM e MNPs-PTX aplicadas simultaneamente, a fim de comprovar que as MNPs são mais eficazes que o tratamento puro.

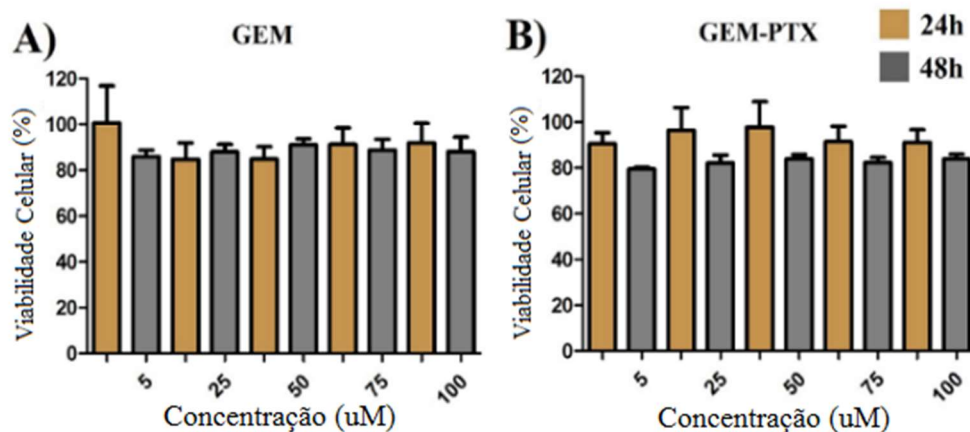


Figura 5: Análise de citotoxicidade de gemcitabina e gemcitabina aliada a paclitaxel em células de câncer de pâncreas (PANC-1) por redução de metil tetrazólio (MTT). PANC-1 (1×10^5 células por poço) foi exposta a A) GEM pura, B) gemcitabina com paclitaxel puros.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os quimioterápicos entram nas células por meio de transporte passivo ou ativo pela membrana. As moléculas dos medicamentos difundem para a célula devido ao seu gradiente de concentração sem gasto de energia pela célula. No entanto, as membranas são seletivamente permeáveis, por isso têm efeitos diferentes na taxa de difusão para diferentes moléculas, o que

pode levar a utilização de grandes quantidades de medicamento causando efeitos adversos. (25) Já as MNPs interagem com a membrana da célula tumoral conseguindo liberar o fármaco na célula alvo sem necessidade de um alto gradiente de concentração. A vantagem dessas nanoestruturas é a possibilidade de diminuir a dose mínima efetiva para o qual o medicamento terá efeito e diminuir os efeitos adversos causados pela inespecificidade no endereçamento.

A gemcitabina atua inibindo a síntese de DNA na fase S, enquanto o paclitaxel bloqueia o ciclo celular na fase G2 inibindo a desmontagem dos microtúbulos. As células resistentes ao tratamento com GEM podem não suportar a atividade de outro agente terapêutico, permitindo que até mesmo a presença de baixas doses desses medicamentos possa ter grande efetividade. (26) Como cada um dos quimioterápicos atua em uma parte do ciclo celular, a combinação dos dois medicamentos poderá ter seus efeitos potencializados, impedindo que as células completem o ciclo mitótico e entrem em processo de apoptose. Em resumo, a gemcitabina e o paclitaxel são 2 agentes com mecanismos de ação únicos com resistência não cruzada e potencial para atividade antitumoral sinérgica, como já registrado na literatura. (27)

A concentração a ser utilizada para tratamento pode variar dependendo da potência e eficácia desejada. A dose máxima tolerável é a maior quantidade de uma droga capaz de produzir efeitos terapêuticos. Normalmente as células saudáveis do organismo são afetadas pela ação dos quimioterápicos. Em estágios avançados do câncer o sistema imune do paciente pode estar debilitado e o tratamento pode acabar por contribuir com efeitos adversos. Já na dose mínima efetiva ou ultra baixas doses tenta-se maximizar os benefícios e minimizar os riscos. No caso, o organismo responde para baixos níveis de concentração do medicamento e o sistema imunológico não é afligido por efeitos negativos e até mesmo pode ser ativado.

Para reduzir a dose mínima efetiva nas células malignas e verificar os efeitos adversos em células saudáveis, optou-se por trabalhar com 1×10^9 partículas/ml nos próximos ensaios de citotoxicidade. Essa concentração de MNPs mostrou resultados perceptíveis e conseguem aumentar os efeitos de ambos os quimioterápicos nas células cancerígenas. Utilizou-se concentrações de $100 \mu\text{M}$ e 5nM na incorporação de gemcitabina e paclitaxel nas nanoestruturas respectivamente. Tais concentrações se mostraram suficientes ao compararmos com outros estudos presentes na literatura. (28)

3.4 Análises de Citotoxicidade de diferentes proporções de MNP-GEM e MNP-PTX

Realizamos o ensaio colorimétrico de metil tetrazólio (MTT), a fim de avaliar a eficiência da combinação de MNPs-GEM e MNPs-PTX aplicadas simultaneamente em diferentes proporções. Devido a limitação de tempo imposta devido a pandemia da Sars-Cov 2,

não conseguimos utilizar a concentração de 10^9 partículas/ml pois não havia MNPs suficientes. Utilizamos então uma concentração de 10^8 partículas/ml nas linhagens PANC-1 e HEPA-RG.

Foram realizados ensaios de nanopartículas com concentrações variadas e com as nanopartículas de membrana puras sem os medicamentos. As MNPs aplicadas às células PANC-1 apresentaram citotoxicidade de 50% após 24h de tratamento, sendo que essa aumentou após 48h. Na linhagem HEPA-RG, as nanopartículas também apresentaram citotoxicidade após 24 h de tratamento, porém as células retomaram o crescimento após 48h.

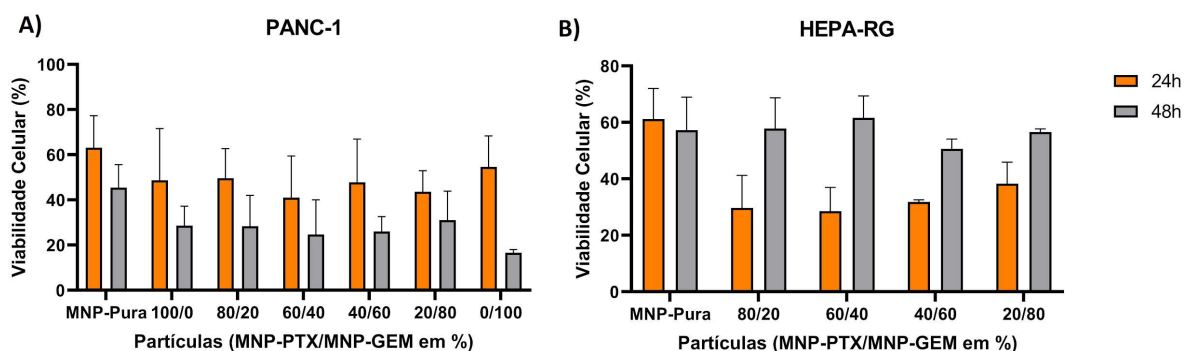


Figura 6: Análise de citotoxicidade de MNPs em células de câncer de pâncreas (PANC-1) e em linhagem saudável de células hepáticas (HEPA-RG) por redução de metil tetrazólio (MTT). 5×10^3 células por poço foram expostas a MNP pura e diferentes concentrações de 10^8 partículas de MNP-PTX/MNP-GEM (em %) em A) PANC-1 e B) HEPA-RG.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nosso objetivo era entregar agentes antineoplásicos dentro de células neoplásicas usando nanopartículas derivadas de membrana plasmática utilizando uma combinação de MNPs-GEM e MNPs-PTX em diferentes proporções. Como já discutido, a gemcitabina e o paclitaxel são 2 agentes com mecanismos de ação únicos com resistência não cruzada e potencial para atividade antitumoral sinérgica. Então, buscamos utilizar diferentes proporções de partículas distintas contendo esses medicamentos. Realizamos ensaio colorimétrico de metiltetrazólio (MTT) para avaliar a toxicidade das MNPs e dos quimioterápicos em linhagens celulares PANC-1 e HEPA-RG, determinando a melhor combinação para uso em experimentos *in vitro*. Nossos dados indicaram que a exposição do câncer pancreático a agentes antineoplásicos puros não promoveu a redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Os MNPs puros exibiram toxicidade após 24h e sendo essa estável após 48h. Enquanto isso, todas as combinações de MNPs-PTX/MNPs-GEM reduziram a viabilidade das células tumorais em 50% após 24h de incubação com 1×10^8 partículas, e após um período de 48h houve aumento da toxicidade. Nanopartículas aplicadas em células saudáveis de fígado também apresentaram citotoxicidade após 24h porém após 48h as células retomaram o crescimento.

Quanto às diferentes proporções de partículas contendo os medicamentos, podemos perceber que elas não apresentam uma diferença estatística que nos permita definir uma proporção melhor do que a outra. Comparando com nossos estudos (29), podemos concluir que a utilização de uma NP conjugada com ambos os medicamentos é mais eficaz que a utilização de nanopartículas distintas e combinadas.

3.5 Interação de nanopartículas com células tumorais e monócitos

Foram sintetizadas nanopartículas previamente coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para investigar a interação entre elas e células do câncer pancreático (PANC-1), células saudáveis do fígado (HEPA-RG) e células imunocompetentes (monócitos). O fluorocromo FITC emite luz verde quando excitado com o comprimento de onda da luz de 488 nm e pode ser detectado por citometria de fluxo. Este ensaio foi realizado apenas com MNPs marcados com FITC para provar a interação com células tumorais. Como resultado, observamos alta porcentagem de células tumorais PANC-1 FITC+ em contraste com a linhagem celular hepática (HEPA-RG)(Figura 2A, 2B, 2D e 2E).

As células imunocompetentes capturam nanopartículas muito rapidamente, limitando a entrega de agentes quimioterápicos. Consequentemente, decidimos investigar a interação das NPs com monócitos de doadores saudáveis para confirmar se as células do sangue periférico fagocitam um grande número de partículas marcadas com fluoresceína (Figura 2C e 2F).

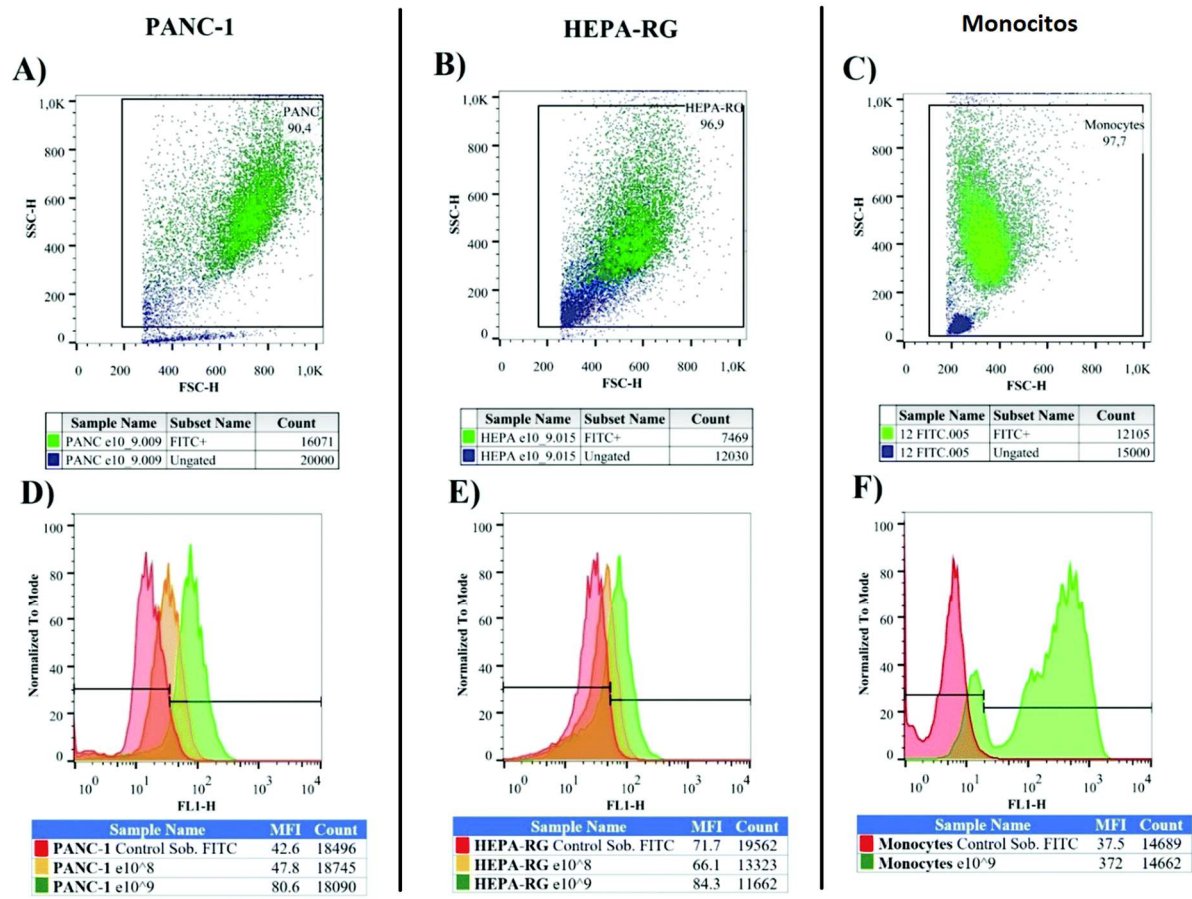


Figura 7: Incorporação de MNPs-FITC em células de câncer pancreático (A) e células saudáveis do fígado (B) (verde) com base em parâmetros de tamanho e granularidade. Histogramas que apresentam a porcentagem de incorporação de nanopartículas em células de câncer pancreático (D) e células hepáticas normais (E), cujo histograma laranja e verde representa células FITC+ (células incubadas a 10^8 e 10^9 partículas/ml, respectivamente) e o histograma vermelho representa a população de células não marcadas. Incorporação de MNPs-FITC em monócitos (verde) também foi observada com base nos parâmetros de tamanho e granularidade (C) e histograma (F), demonstrando a porcentagem de nanopartículas incorporadas células imunocompetentes.

Fonte: Elaborada pelo autor

O ensaio de interação com MNPs-FITC+ revelou a interação entre nanopartículas com células tumorais PANC-1, células HEPA-RG e monócitos primários de doadores saudáveis, observando uma alta intensidade mediana de fluorescência (MFI) em células pancreáticas FITC+ e para glóbulos brancos. Após o tratamento com MNPs, as células do câncer pancreático FITC+ dobraram o valor de MFI em relação aos seus respectivos grupos de controle (células não expostas às MNPs). Esse resultado não foi observado nas linhagens de células HEPA-RG, indicando menor interação na superfície das células hepáticas e grande especificidade para PANC-1. Em monócitos, os valores de MFI indicaram uma alta taxa de fagocitose das MNPs. Nossos resultados indicam que 97% dos monócitos eram FITC + com valores de MFI uma ordem de grandeza maior que os valores obtidos no controle. Essas resoluções são importantes

para iniciar trabalhos na avaliação da expressão de antígenos e na expressão de marcadores de superfície celular devido a interação com as MNPs.

3.6 Morte celular induzida por apoptose e / ou necrose.

O experimento de citotoxicidade nos indica atividade metabólica das células, porém viu-se necessário verificar a morte das células cancerosas usando o ensaio de Anexina-V e 7AAD por citometria de fluxo.

Depois de expostas a MNPs-GEM-PTX, as células PANC-1 sofreram morte celular superior ((7AAD + / anexina V +) = 27%) do que a HEPA-RG ((7AAD + / anexina V +) = 8%). Esses resultados foram opostos à exposição a MNP-GEM e MNP-PTX, refletindo efeitos semelhantes aos de MNPs puras. A combinação de PTX e GEM em uma única nanopartícula (MNPs-GEM-PTX) aumentou os efeitos citotóxicos em células neoplásicas comparados a MNPs-GEM e GEM, indicando que o agente estabilizador de microtúbulos favorece a atividade da gemcitabina em células neoplásicas de pâncreas, conforme revelado por estudos anteriores em ensaios clínicos com drogas antineoplásicas puras(27).

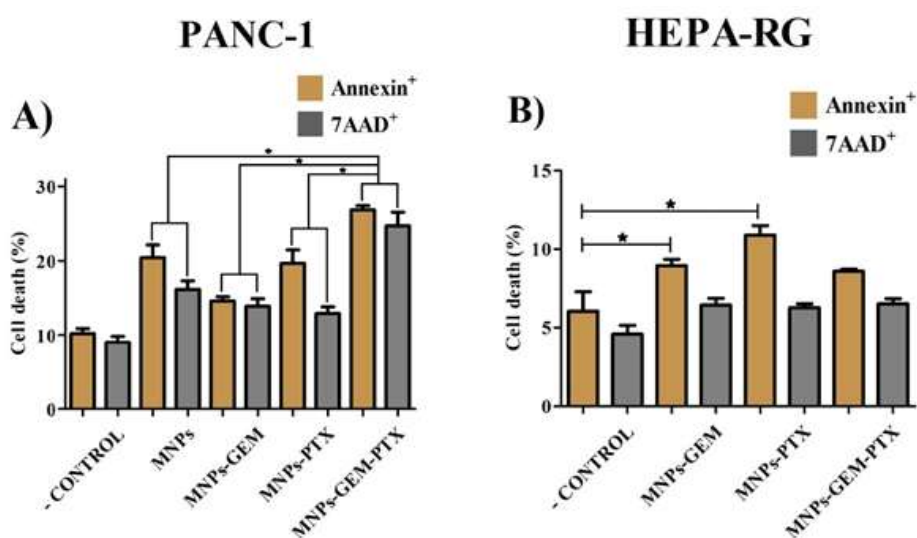


Figura 8: Efeitos das nanopartículas derivadas da membrana plasmática na viabilidade de A) carcinoma pancreático (PANC-1) e B) células saudáveis (HEPA-RG) (Anexina V e 7AAD) após 48h expostos a MNPs, MNPs-GEM, MNPs-PTX, MNPs-GEM-PTX.

Fonte: Elaborada pelo autor

O ensaio de apoptose/necrose confirmou, então, a baixa toxicidade de MNPs em células PANC-1 e HEPA-RG. Entretanto, observamos toxicidade semelhante entre nanopartículas conjugadas com apenas um quimioterápico e a respectiva exposição com grupos de controle de nanopartículas (MNPs), indicando baixa eficiência terapêutica dos fármacos quando transportados individualmente em células de câncer pancreático. A incorporação de PTX (MNPs-GEM-PTX) aumentou a toxicidade das nanopartículas, potencializando os percentuais

de morte celular, o que nos leva a concluir que a presença de baixas doses de PTX melhoram a capacidade citotóxica de MNPs-GEM. Portanto, nossos resultados sugerem que MNPs-GEM-PTX são mais eficazes do que GEM puro e PTX puro em um curto período de tratamento. Este achado é compatível com estudos anteriores, nos quais nanopartículas complexadas com GEM após a administração de PTX puro exibiram maior toxicidade do que o tratamento simples com GEM em células de câncer de pulmão, mama e ovário. (30-32)

O resultado mais interessante foi observado no grupo MNPs-GEM-PTX, indicando que o paclitaxel favorece a atividade de MNPs-GEM em células tumorais. Nosso objetivo de entregar agentes antineoplásicos dentro de células neoplásicas usando nanopartículas derivadas da membrana plasmática foi alcançado com sucesso, uma vez que MNPs-GEM-PTX induziu mais apoptose/necrose em PANC-1 do que em HEPA-RG.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizadas nanopartículas lipídicas com os principais componentes da membrana plasmática derivada de células de carcinoma pancreático (PANC-1) e conjugadas com baixas doses de GEM e PTX para reduzir a dose efetiva nas células neoplásicas. As análises físico químicas mostraram partículas estáveis em meio de cultura e capazes de conduzir medicamentos de forma eficaz. Nossos estudos revelaram que os MNPs são eficientes carreadores de quimioterápicos para o tratamento de carcinoma pancreático, produzindo efeitos citotóxicos superiores a terapia convencional usualmente utilizada na clínica e não apresentando citotoxicidade em células hepáticas saudáveis (HEPA-RG). Foi observado também que diferentes proporções de nanopartículas distintas contendo medicamentos não apresentam uma diferença na eficácia das nanopartículas quando comparada com nanopartículas contendo ambos os quimioterápicos. Os ensaios de apoptose/necrose mostraram que a combinação de MNP-GEM com o PTX favorece a atividade citotóxica em células neoplásicas de pâncreas e não nas células saudáveis hepáticas. Por fim, nossos resultados contribuem para o entendimento da aplicação dos MNPs como nanocarreadores de agentes antineoplásicos e seus efeitos no câncer pancreático, nas células saudáveis e iniciando estudos para observação de interações com células imunocompetentes.

REFERÊNCIAS

- 1 ROTH, Gregory A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, 2018.
- 2 BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- 3 MCGUIGAN, Andrew *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 43, p. 4846, 2018.
- 4 FELDMANN, Georg *et al.* Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, v. 14, n. 3, p. 224-232, 2007.
- 5 ABOTALEB, Mariam *et al.* Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 458-477, 2018.
- 6 FIORINI, Claudia *et al.* Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular cell research**, v. 1853, n. 1, p. 89-100, 2015.
- 7 SPRINGFELD, Christoph *et al.* Chemotherapy for pancreatic cancer. **La Presse Medicale**, v. 48, n. 3, p. e159-e174, 2019.
- 8 LUNDY, David J. *et al.* Distribution of systemically administered nanoparticles reveals a size-dependent effect immediately following cardiac ischaemia-reperfusion injury. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- 9 PEER, Dan *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751-760, 2007.
- 10 ROBEY, Robert W. *et al.* ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 625-633, 2010.
- 11 VON HOFF, Daniel D. *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1691-1703, 2013.
- 12 BAGHDADI, Muhammad *et al.* Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. **Cancer Research**, v. 76, n. 20, p. 6030-6042, 2016.
- 13 TANG, Wei *et al.* Paclitaxel nanoparticle awakens immune system to fight against cancer. **Nanoscale**, v. 9, n. 19, p. 6529-6536, 2017.
- 14 LUAN, Xin *et al.* Tumor priming using metronomic chemotherapy with neovasculature-targeted, nanoparticulate paclitaxel. **Biomaterials**, v. 95, p. 60-73, 2016.
- 15 AMOOZGAR, Zohreh *et al.* Dual-layer surface coating of PLGA-based nanoparticles provides slow-release drug delivery to achieve metronomic therapy in a paclitaxel-resistant murine ovarian cancer model. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 11, p. 4187-4194, 2014.
- 16 KROLL, Ashley V.; FANG, Ronnie H.; ZHANG, Liangfang. Biointerfacing and applications of cell membrane-coated nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 23-32, 2017.

- 17 YURKIN, Svetlana T.; WANG, Zhenjia. Cell membrane-derived nanoparticles: emerging clinical opportunities for targeted drug delivery. **Nanomedicine**, v. 12, n. 16, p. 2007-2019, 2017.
- 18 MOON, James J. *et al.* Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses. **Nature Materials**, v. 10, n. 3, p. 243-251, 2011.
- 19 FINKELSTEIN, Morris; WEISSMANN, Gerald. The introduction of enzymes into cells by means of liposomes. **Journal of Lipid Research**, v. 19, n. 3, p. 289-303, 1978.
- 20 KATAOKA, Tateshi; KINSKY, Joseph R. Williamson StephenC. Release of macromolecular markers (enzymes) from liposomes treated with antibody and complement: An attempt at correlation with electron microscopic observations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- biomembranes**, v. 298, n. 2, p. 158-179, 1973.
- 21 SUN, Huiping *et al.* Cancer-cell-biomimetic nanoparticles for targeted therapy of homotypic tumors. **Advanced Materials**, v. 28, n. 43, p. 9581-9588, 2016.
- 22 CHEN, Ze *et al.* Cancer cell membrane–biomimetic nanoparticles for homologous-targeting dual-modal imaging and photothermal therapy. **ACS Nano**, v. 10, n. 11, p. 10049-10057, 2016.
- 23 BEATTY, Gregory L.; GLADNEY, Whitney L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 4, p. 687-692, 2015.
- 24 LUND, Rikke *et al.* Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 6, p. 3078-3090, 2009.
- 25 CHEN, Xiaoming *et al.* Internalization pathways of nanoparticles and their interaction with a vesicle. **Soft Matter**, v. 9, n. 31, p. 7592-7600, 2013.
- 26 HORWITZ, S. B. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. **Annals of Oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 5, p. S3-6, 1994.
- 27 ALLOUACHE, Djelila *et al.* First-line therapy with gemcitabine and paclitaxel in locally, recurrent or metastatic breast cancer: a phase II study. **BMC Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2005.
- 28 PEDRO, Irma Danielle Rodrigues *et al.* Optimization and in vitro/in vivo performance of paclitaxel-loaded nanostructured lipid carriers for breast cancer treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101370, 2019.
- 29 COMPARETTI, Edson J. *et al.* Cancer cell membrane-derived nanoparticles improve the activity of gemcitabine and paclitaxel on pancreatic cancer cells and coordinate immunoregulatory properties on professional antigen-presenting cells. **Materials Advances**, v. 1, n. 6, p. 1775-1787, 2020.
- 30 ZHANG, Rui *et al.* Sequential combination therapy of ovarian cancer with degradable N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer paclitaxel and gemcitabine conjugates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 33, p. 12181-12186, 2014.
- 31 LEI, Meng *et al.* Co-delivery of paclitaxel and gemcitabine via a self-assembling nanoparticle for targeted treatment of breast cancer. **RSC Advances**, v. 9, n. 10, p. 5512-5520, 2019.
- 32 TACHIHIRA, Motoko *et al.* A multi-center, phase II trial of nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 7135, 2019.