

UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Raquel González Sterman

**Atividade antitumoral de cabazitaxel transportado por nanovesículas biomiméticas em
células de carcinoma pulmonar**

São Carlos
2021

RAQUEL GONZÁLEZ STERMAN

**Atividade antitumoral de cabazitaxel transportado por nanovesículas biomiméticas em
células de carcinoma pulmonar**

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.

Sterman, Raquel González
Atividade antitumoral de cabazitaxel transportado por nanovesículas biomiméticas em células de carcinoma pulmonar / Raquel González Sterman; orientador Valtencir Zucolotto -- São Carlos, 2021.
31 p.

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

1. Nanomedicina. 2. Carcinoma pulmonar. 3. Nanovesículas biomiméticas. 4. Cabazitaxel. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Mariselma, e meu irmão Gabriel, por todo o suporte dado para minha educação e pelo apoio incondicional. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

À minha família, em especial às minhas avós, pelo amor e carinho compartilhados.

À minha segunda família, formada pelas amizades maravilhosas com as quais tive o prazer de dividir os últimos anos. A graduação foi infinitamente melhor estando com vocês.

À Bidu, por ser uma inspiração de dedicação e um porto seguro para aqueles

que considera seus amigos. À Amanda, que sempre alegra todos ao seu redor com seu carisma e felicidade. À Paulina, por ser um exemplo de compaixão e paciência,
e por ter me acolhido logo que ingressei na faculdade.

Às minhas amigas de longa data, em especial Beatriz, Mariana e Laura, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Vocês estarão comigo sempre, mesmo que distantes.

Agradeço também aos professores que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Em especial, ao professor Dr. Valtencir Zucolotto, ao Dr. Edson Comparetti e à Dra. Valéria Maria de Oliveira Cardoso, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço por fim a todos do grupo GNano, que fazem do ambiente de trabalho um lugar perfeito para aprender e crescer.

RESUMO

STERMAN, R. G. **Atividade antitumoral de cabazitaxel transportado por nanovesículas biomiméticas em células de carcinoma pulmonar.** 2021. 31p. 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 considerado, mundialmente, uma das principais causas de morte. O carcinoma de pulmão está entre as formas mais letais da doença, sendo frequentemente diagnosticado em estágios mais avançados. Tendo em vista as dificuldades enfrentadas nos tratamentos tradicionais, como a toxicidade e resistência aos quimioterápicos, a necessidade de terapias mais precisas e com menores efeitos colaterais sob células saudáveis e imunes torna-se imprescindível. Este trabalho propõe a utilização de nanovesículas (NV) biomiméticas, formadas a partir dos componentes principais da membrana celular de adenocarcinoma pulmonar (A549), para entrega dirigida de pequenas doses do antitumoral cabazitaxel no câncer de pulmão. As NV biomiméticas foram sintetizadas, caracterizadas e sua interação com as células tumorais foi investigada por meio de microscopia de fluorescência confocal e citometria de fluxo. O tamanho e potencial zeta das NV foram medidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Não foram observadas alterações significativas no tamanho e potencial zeta das NV sem fármaco (113 ± 5 nm; -12 ± 1 mV), em relação àquelas carregadas com cabazitaxel ($136,2 \pm 0,5$ nm; $-11,6 \pm 0,9$ mV). Os estudos de interação mostraram que as NV foram internalizadas com sucesso pelas células tumorais. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* (MTT) foram realizados utilizando-se CTX puro, NV vazias e com CTX (NV-CTX). Os resultados demonstraram uma redução de viabilidade celular na concentração de 500 ng/ml de CTX puro, mas com retomada do crescimento celular após 24h. O mesmo não ocorreu no tratamento com NV-CTX, onde foi observada uma redução de 75% da viabilidade celular em 48h. De forma a complementar aos estudos de citotoxicidade, foram realizados ensaios de morte celular por apoptose e/ou necrose por citometria de fluxo, e os resultados demonstraram uma predominância de morte por apoptose, provavelmente devido ao mecanismo de ação do fármaco. A morte celular foi maior para células submetidas ao tratamento com NV-CTX em concentração de 10^8 partículas/ml, quando comparado com CTX puro, em 48h de incubação, demonstrando maior efetividade quando o CTX está encapsulado em NV. Os resultados obtidos neste estudo mostram o potencial dos sistemas para o tratamento antitumoral do câncer de pulmão. Novos estudos para comprovação estatística dos resultados devem ser realizados, além de testes de MTT e morte por apoptose/necrose em linhagem celular saudável a fim de investigar a especificidade do tratamento.

Palavras-chave: Nanomedicina. Carcinoma pulmonar. Nanovesículas biomiméticas. Cabazitaxel.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	Cultura celular	13
2.2	Síntese das NV	13
2.3	Incorporação de CTX nas NV	13
2.4	Caracterização físico-química das NV	14
2.4.1	Análise de tamanho e potencial zeta das NV através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de tamanho da nanopartícula (NTA)	14
2.4.2	Análise da topografia de superfície por microscopia de força atômica (AFM)	14
2.4.3	Espectroscopia Raman	14
2.5	Internalização celular das NV por células de carcinoma pulmonar	14
2.6	Ensaio de citotoxicidade (MTT)	15
2.7	Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo	15
3	RESULTADOS	17
3.1	Síntese e Caracterização físico-química das NV	17
3.2	Interação das NV com células tumorais	19
3.3	Ensaios in vitro de viabilidade celular	21
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo, com uma taxa de mortalidade e incidência que aumenta significativamente todo ano. (1) Em 2020, foram registrados 18,1 milhões de novos casos, sendo o câncer de pulmão o segundo mais frequentemente diagnosticado, com 2,2 milhões de casos novos e 1,8 milhões de óbitos. (2) Além de sua alta incidência, dentre os diversos tipos de câncer, as neoplasias pulmonares apresentam maior letalidade, com uma taxa de mortalidade de 86%, mesmo após 5 anos do diagnóstico. O alto índice de mortalidade está relacionado à detecção tardia da doença, o que dificulta significativamente o tratamento. (3) O câncer de pulmão pode ser classificado em dois tipos: o câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). O principal fator para o desenvolvimento de ambos está diretamente relacionado ao uso de tabaco, sendo o CPNPC apresentando a maior ocorrência (83% dos casos) quando comparado ao CPPC. (4) O tratamento varia de acordo com o estágio da doença, sendo a cirurgia indicada principalmente para estágios iniciais, e a radioterapia e/ou quimioterapia indicada nos estágios mais avançados.

A quimioterapia, em geral, utiliza um ou mais fármacos para o tratamento antitumoral. Estes fármacos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, entre eles estão os agentes alquilantes, antimetabólicos, inibidores de topoisomerase, antraciclinas, taxanos e inibidores de mitose. (5) Os taxanos ganharam destaque como agentes antitumorais, pois atuam como inibidores de microtúbulos, estruturas poliméricas do citoesqueleto compostos de duas subunidades (α e β). Essas estruturas são essenciais para a divisão e sinalização celular e para o transporte de vesículas, organelas e outros componentes celulares de um ponto a outro no interior da célula, tornando-as potenciais alvos para tratamentos anticâncer. (6)

Cabazitaxel (CTX) é um composto do grupo taxano, que ganhou aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico em 2010. (7) Este quimioterápico atua na estabilidade da subunidade β da tubulina, levando à inibição dos microtúbulos e, consequentemente, apoptose em células tumorais. (5) CTX vem sendo estudado para o tratamento de diversos tipos de tumores, como câncer de próstata (8), mama (9), ovário (10), estômago (11) e pulmão. (12) Os estudos em CPNPC utilizando CTX mostraram-se promissores, principalmente em pacientes que apresentaram resistência tumoral aos tratamentos prévios com outros quimioterápicos. (12)

Um dos maiores problemas enfrentados com a utilização de quimioterápicos é a toxicidade em órgãos e células saudáveis, o que representa uma limitação. Em contraste com

a abordagem tradicional quimioterápica, na qual os fármacos são administrados na sua dosagem máxima, estudos recentes mostram que a administração de pequenas doses de quimioterápicos em sistemas nanoestruturados pode ser mais vantajoso (13-14), pois reduzem a toxicidade em células saudáveis e previnem a quimiorresistência celular, a redução de dose e da imunossupressão de macrófagos e linfócitos no microambiente tumoral. (15) Atualmente, a nanotecnologia vem sendo amplamente utilizada como estratégia para entrega controlada e específica no órgão alvo, aumentando a biodistribuição e meia-vida dos fármacos. (16) Os nanocarreadores podem vetorizar um ou mais quimioterápicos para o sítio tumoral e, dependendo do seu tamanho, entregar o fármaco de forma passiva por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), um fenômeno característico de tecidos tumorais devido à angiogênese. (17) Além do acúmulo passivo, o direcionamento ativo de nanocarreadores aos sítios de interesse pode ser alcançado através da funcionalização superficial de nanopartículas (NPs) com biomoléculas específicas, como proteínas, que identificam as superfícies das células alvo (18) e outros elementos da membrana celular.

Embora diversos estudos mostrem que essa funcionalização de nanocarreadores represente uma abordagem promissora, o processo é complexo e caro. Da mesma forma, o uso de materiais poliméricos sintéticos ou naturais para entrega específica também sejam amplamente utilizados no campo da entrega de fármacos antitumorais, o processo também pode ser caro e muitas vezes utiliza condições reacionais extremas, como elevada temperatura e solventes orgânicos tóxicos. Além disso, embora a nanotecnologia tenha demonstrado resultados muito promissores no tratamento de diversas patologias, especialmente o câncer, o sucesso dos tratamentos e os grandes progressos clínicos são dependentes da capacidade dos nanosistemas em escapar das células de defesa do sistema imunológico, atravessar as barreiras biológicas e se acumularem nos órgãos e tecidos doentes. (19) Dadas as limitações dos materiais poliméricos sintéticos ou naturais, e o alto custo de processos utilizando a funcionalização, o desenvolvimento de estratégias biomiméticas para liberação de fármacos antitumorais vem ganhando popularidade. (20)

Avanços recentes na bioengenharia vêm ganhando destaque ao utilizarem componentes principais da membrana de células saudáveis e tumorais para camuflar os sistemas das células fagocíticas e aumentar sua especificidade e atividade nos sítios alvos. (21) As nanovesículas (NV) biomiméticas são obtidas a partir do cultivo celular, e moldadas em NV através das técnicas de ultracentrifugação e extrusão. Embora o rendimento do processo seja pequeno, é uma estratégia muito vantajosa, pois preserva a funcionalidade das proteínas provenientes das células de origem (Figura 1). (22) Basicamente, estas NV

biomiméticas caracterizam-se por pequenas vesículas (escala nanométrica) de forma esférica, compostas por várias proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, que são capazes de mimetizar as propriedades naturais das células originais. Além disso, as vantagens dos nanocarreadores biomiméticos se devem à sua elevada biocompatibilidade, redução da captação por macrófagos, redução da depuração pelo sangue e capacidade de direcionamento específico e de acúmulo no tecido tumoral. Apesar do baixo rendimento na produção das NV e, algumas vezes, da heterogeneidade de tamanho, é um método simples e de fácil execução. Esse processo tem demonstrado ser muito mais eficiente, quando comparado à obtenção das NV geradas espontaneamente. (20,22-23) Essa abordagem pode ser uma grande promessa no campo da oncologia pois esse tipo de abordagem aumenta a especificidade, já que as NV possuem proteínas de superfície, que por afinidade, favorecem o processo de adesão e interação com as células tumorais. (24)

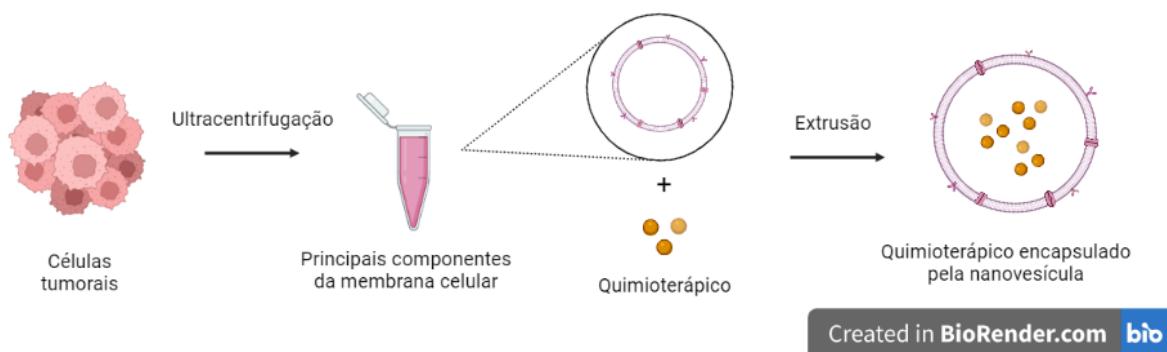


Figura 1- Processo de ultracentrifugação e extrusão para obtenção de nanovesículas biomiméticas carreadoras de quimioterápicos. As nanovesículas são formadas a partir dos componentes da membrana celular de células tumorais.

Fonte: Elaborada pela autora em *BioRender.com*.

Diante do exposto e visando contribuir para a descoberta de novas alternativas para nanomedicina e, em especial, para o tratamento do câncer de pulmão, o presente estudo tem como proposta o desenvolvimento de um tipo de NV biomimética a partir de membranas de células de carcinoma pulmonar (A549), através da técnica de extrusão, para entrega específica do CTX nas células tumorais do câncer de pulmão. Esta plataforma que combina o uso de NV carregadas com fármaco antitumoral (CTX) pode oferecer uma oportunidade única para o tratamento do câncer de pulmão. Os sistemas foram sintetizados e caracterizados físico-quimicamente e seu potencial antitumoral foi avaliado através dos estudos *in vitro* de citotoxicidade (MTT) e morte celular por citometria de fluxo. A capacidade de internalização das NV nas células tumorais (A549) também foi avaliada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura celular

Linhagem de carcinoma pulmonar humano (A549) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (Brasil) e utilizadas na síntese das NV e nos ensaios de citotoxicidade e citometria. As células foram cultivadas em meio completo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina), em uma incubadora umidificada, temperatura de 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂. As células foram incubadas até completarem a monocamada, tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco)) e lavadas em meio de cultura completo para uso na síntese e nos ensaios celulares.

2.2 Síntese das NV

As células de carcinoma pulmonar (A549), cultivadas de acordo com item 2.1, foram isoladas e purificadas por ultracentrifugação. Para a formação das NV, foi utilizado o processo de extrusão. Brevemente, as células foram tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco)), colhidas e lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) por centrifugação (1800 rpm, por 4 min). Em seguida, as células foram lisadas, por incubação em tampão hipotônico durante 20 min a 4°C, centrifugadas à 15.000 g, por 15 min a 4°C. Esse processo foi repetido por mais 3 vezes. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 100.000 g, durante 2h a 4°C, utilizando ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, USA). O *pellet* contendo as membranas foi disperso em 1 ml de PBS contendo Inibidor de Protease Completo (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

2.3 Incorporação de CTX nas NV

A incorporação de CTX nas NV foi realizada misturando 1 ml da suspensão de NV (10⁹ partícula/ml) com uma concentração de 500 ng/ml de quimioterápico, dissolvida em PBS e submetida à extrusão através de uma membrana (100 nm), à temperatura ambiente (~25 °C), utilizando-se um nano-extruder (Malvern). A solução foi centrifugada a 100.000 g durante 2h e lavadas com PBS para remover o CTX não encapsulado. Os *pellet* NV-CTX foram ressuspensos em 1 ml de PBS sob sonicação suave por 30 min a 40 kHz.

2.4 Caracterização físico-química das NV

2.4.1 Análise de tamanho e potencial zeta das NV através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de tamanho da nanopartícula (NTA)

O tamanho e o índice polidispersidade (PDI) foram medidos utilizando equipamento DLS (Nano-ZS spectrometer-Malvern Instruments, UK) usando espectroscopia de foto correlação, no comprimento de onda de 633nm e ângulo de detecção de 90°, e temperatura de 25°C. O potencial zeta foi avaliado pela mobilidade eletroforética das partículas a 25°C. Para estas análises 100 µL das NV em suspensão foram diluídas em 1 mL de PBS. Os resultados foram apresentados pela média e desvio padrão das três medidas realizadas.

O tamanho também foi analisado pelo analisador de tamanho de nanopartículas (NTA), que também fornece informações sobre a concentração de partículas. Para esse ensaio, as NV puras e carregadas com CTX (NV-CTX) em suspensão (PBS) foram diluídas em PBS (1:10). Foram realizadas três medidas e os resultados apresentados pela média e desvio padrão das três medidas realizadas.

2.4.2 Análise da topografia de superfície por microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia das NV foi analisada por Microscopia de Força Atômica (AFM) em um Nanosurf modelo EasyScan 2 Flex AFM para medida de dimensões externas e verificação da presença de materiais adsorvidos.

2.4.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi realizada utilizando um microscópio Renishaw inVia™ Raman, a fim de verificar a composição das amostras estudadas. Os espectros foram coletados na faixa 300-3000 cm⁻¹, utilizando laser de 532 nm com intensidade de 5%, 3 acumulações e 30 segundos para cada medida.

2.5 Internalização celular das NV por células de carcinoma pulmonar

As células (A549) (cultivadas conforme o item 2.1) foram expostas a uma solução de 10⁸ partículas/ml de NV complexada com isocianato de fluoresceína (FITC) (NV-FITC) durante 48h. Para marcação, 10⁹ partículas foram dispersas em 1 mL de PBS, seguida pela adição de 0.1 mg FITC. A mistura foi agitada em ambiente escuro a 4°C, durante 12h. Para separar o complexo NV-FITC da fluoresceína não conjugada, a solução de NV foi submetida a uma diálise de 12h em uma membrana de 12 kDa. No final, a suspensão foi recuperada por

centrifugação e ressuspensas com PBS. Essas NV fluoro-marcadas foram utilizadas para verificar a internalização das NV por células de câncer pulmonar (A549).

A internalização das NV foi confirmada pela Microscopia Confocal (Zeiss LSM 710) e os resultados analisados pelo software ZEN 2.6 *Blue Edition*. A internalização também foi confirmada por citometria de fluxo (modelo FACS Calibur) e os resultados analisados pelo software FlowJo, versão vX. 10.6.

2.6 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Para avaliar o efeito das NV nas células A549, primeiro verificamos seu efeito sobre a viabilidade celular, utilizando o ensaio colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A técnica baseia-se na redução do sal em cristais de formazan através do metabolismo mitocondrial, que reflete a atividade de células vivas e é utilizado como indicador da viabilidade das células cultivadas. O tratamento foi realizado por adição de NV puras (sem fármaco), NV-CTX e CTX puro à cultura de células (1×10^4 células por poço) numa placa de 96 poços fundo chato por 24 e 48h.

Foram testados: a) NV puras; b) NV com CTX (NV-CTX); c) apenas CTX puro. 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, 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 200 uL de dimetilsulfóxido (DMSO), para posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm, usando o Espectrofotômetro SpectraMax M2E (Molecular Device, Inc.).

2.7 Ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo

A atividade citotóxica foi investigada por citometria de fluxo, utilizando as concentrações (10^6 , 10^7 e 10^8 partículas/ml) previamente estipuladas pelo ensaio de MTT (item 2.8) referentes a NV pura e NV com CTX para cada 1×10^5 células. Para isso, culturas de A549 foram plaqueadas (placas de 12 poços) e as células submetidas aos tratamentos. Após 48h de incubação, o sobrenadante foi removido, as partículas em suspensão e os *debris* celulares foram removidos por lavagem delicada com meio de cultura à 37°C. Cerca de 1×10^5 células foram recolhidas em *eppendorfs* e centrifugadas a 10.000 rpm, por 30 seg, e ressuspensas em tampão isoton (PBS, contendo 0,5 % de BSA). Em seguida, as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (~25 °C) com Anexina V. As células foram

recolhidas em tubos de citometria e marcadas com 7AAD para sua aquisição no citômetro de fluxo.

3 RESULTADOS

3.1 Síntese e Caracterização físico-química das NV

Após a extração das membranas celulares, as NV foram obtidas no tamanho desejado (100 nm) por meio da técnica de extrusão, que se baseia na passagem forçada das membranas extraídas através do extrusor, equipado com um filtro de membrana (com poro de 100 nm). O tamanho, PDI e potencial zeta das NV vazias e carregadas com CTX foram obtidos pela técnica DLS. Adicionalmente, o tamanho também avaliado pelo NTA, o qual permite obter também informações da concentração das NV puras (NV) e contendo CTX (NV-CTX). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de concentração, tamanho, PDI e potencial zeta das nanovesículas com e sem CTX.

NTA			DLS		
Nano vesículas	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/ml)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta ζ (mV)
NV	118 ± 3	$(2,2 \pm 0,2).10^9$	$136,2 \pm 0,5$	$0,119 \pm 0,004$	-12 ± 1
NV-CTX	158 ± 2	$(7 \pm 1).10^8$	113 ± 5	$0,33 \pm 0,02$	$-11,6 \pm 0,9$

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados no DLS mostraram uma pequena variação no diâmetro entre NV vazias e carregadas com CTX, mas com variação entre o tamanho medido no DLS e no NTA. Ambas técnicas utilizam o mesmo parâmetro físico (coeficiente de difusão) para determinar o tamanho das nanopartículas, o que permite comparação entre os resultados obtidos. No entanto, o DLS obtém este parâmetro por meio da intensidade da luz espalhada, enquanto que no NTA, mesmo parâmetro tamanho é obtido pelo número de partículas analisadas. Esta diferença pode gerar discrepâncias nos tamanhos medidos, especialmente quando não estão perfeitamente monodispersas em soluções. (25) Como o PDI obtido indica certa heterogeneidade de distribuição das NV, a utilização do NTA é preferível para obtenção do diâmetro. É importante ressaltar, que os tamanhos observados (< 200 nm) não são parâmetros críticos para o objetivo deste trabalho, já que de acordo com Foroozandeh e colaboradores, nanopartículas com diâmetros inferiores a 200 nm são internalizados por endocitose, mediada por clatrina ou caveolina. (26) O potencial zeta de ambas as amostras (com e sem o CTX) foi negativo, o que era esperado, uma vez que as NV foram formadas a partir dos principais

componentes da membrana celular tumoral, que possui potencial negativo. Em módulo, um alto valor de potencial zeta indica boa estabilidade do nanosistema, pois as forças de repulsão evitam a agregação das NV. Além disso, valores de potencial zeta próximo à -10 mV favorecem o tempo de circulação das NV e sua distribuição homogênea no sítio tumoral. Nanopartículas com potenciais zeta muito elevados tendem a interagir com proteínas presentes na matriz extracelular, dificultando seu transporte através das membranas. [16]

A superfície das NV foi caracterizada por AFM, na qual é possível observar a topografia de superfície, ou seja, a morfologia superficial das NV com e sem CTX (Figura 2).

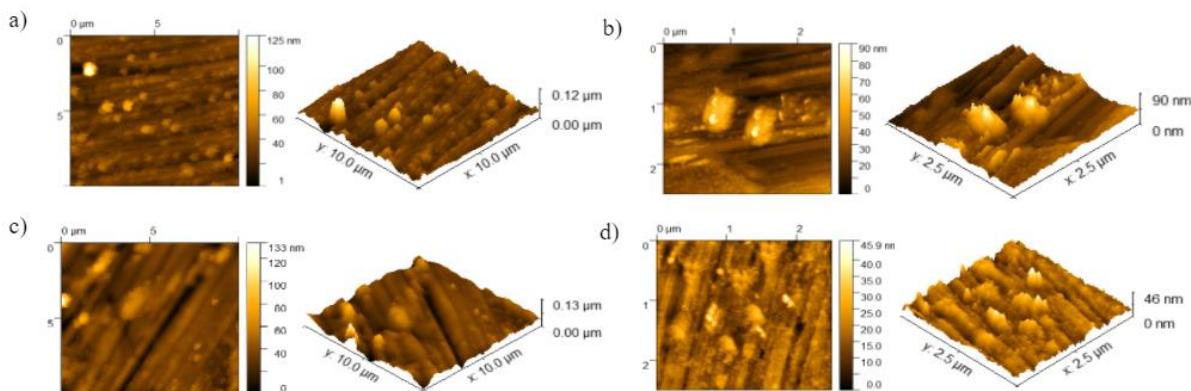


Figura 2 - Imagens de AFM da superfície de nanovesículas de membrana com e sem cabazitaxel. (a) NV puras em resolução de 10 μm x 10 μm , (b) NV puras em resolução de 2,5 μm x 2,5 μm , (c) NV-CTX em resolução de 10 μm x 10 μm , (d) NV-CTX em resolução de 2,5 μm x 2,5 μm .

Fonte: Elaborada pela autora

A morfologia das NV é de extrema importância, pois podem influenciar na sua interação e internalização com membranas das células tumorais. (27) Não foram observadas alterações na superfície das NV após a incorporação do CTX, o que pode ser uma característica favorável à internalização das NV pelas células tumorais.

A composição das NV com e sem CTX foi investigada por meio da espectroscopia Raman. A composição da amostra pode ser obtida pela interação entre luz-matéria, fornecendo um espectro característico de vibrações das moléculas presentes, como uma espécie de impressão digital do material. A utilização desta técnica em componentes celulares pode ser desafiadora, uma vez que há uma grande superposição de bandas para diferentes moléculas. As regiões I e II do espectro (Figura 3) correspondem a ligações presentes em lipídios (CH_2 e C-C-O, respectivamente). (28) Já a região III está relacionada às ligações C-C. (29) Verificou-se também duas pequenas bandas na região 800-1050 cm^{-1} , característicos de ligações C-H. (28) A região IV está relacionada ao grupo amina (NH_2), presente em proteínas. (30)

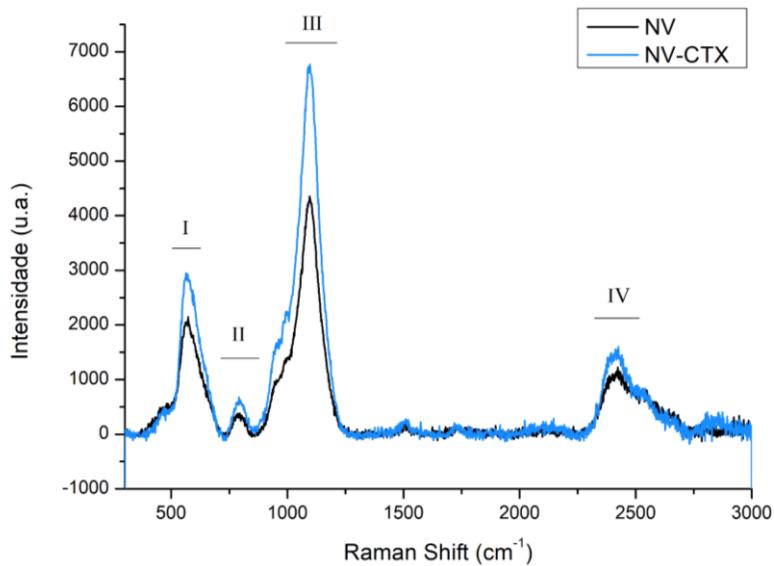


Figura 3 - Espectro Raman das nanovesículas com e sem quimioterápico (NV-CTX e NV, respectivamente). Os espectros foram coletados com laser de 532 nm, 3 acumulações e tempo de aquisição de 30 s para cada medida.

Fonte: Elaborada pela autora

Para as amostras contendo CTX (NV-CTX) não foram observadas alterações nos grupos funcionais encontrados, o que era esperado, uma vez que o CTX é uma molécula que possui os mesmos grupos funcionais presentes em estruturas celulares, com uma banda característica na região de 1000 cm^{-1} , como mostra a Figura 3. (31)

3.2 Interação das NV com células tumorais

A interação das NV com as células vivas de carcinoma pulmonar (A549), foi investigada por meio de ensaios *in vitro* de citometria de fluxo. Para isso foram usadas NV puras marcadas com FITC, um fluorocromo que emite luz verde quando excitado em 488 nm. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

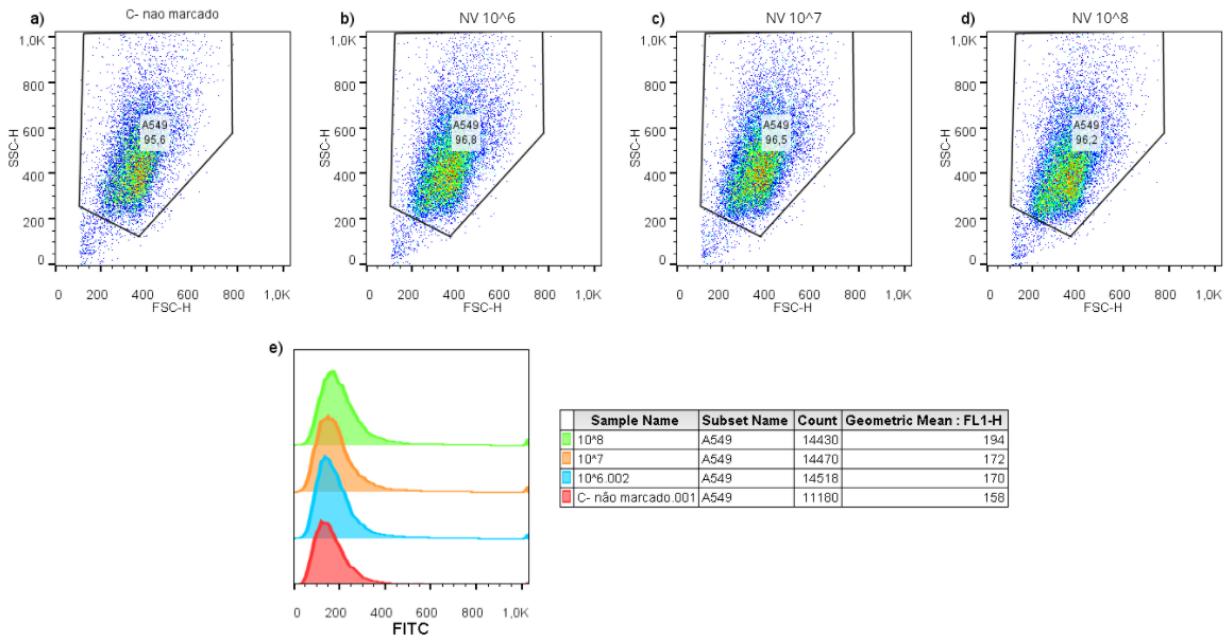


Figura 4 - Citometria de fluxo da incorporação de NV marcadas com FITC em células de carcinoma pulmonar. Gráfico de tamanho (FSC-H) x granulosidade (SSC-H) de células tumorais incubadas com NV-FITC por um período de 48h. As células foram incubadas com NV-FITC em concentrações de (b) 10^6 partículas/ml, (c) 10^7 partículas/ml e (d) 10^8 partículas/ml. O histograma (e) mostra o deslocamento da banda de fluorescência em FITC para as células tumorais expostas às nanovesículas marcadas. Estes deslocamentos são comparados ao grupo controle (células não expostas à NV-FITC), em vermelho. A fluorescência é quantificada por meio da intensidade média de fluorescência (MFI), representada em (e) por *Geometric Mean: FL1-H*.

Fonte: Elaborada pela autora

A presença de NV nas células tumorais foi confirmada por meio da intensidade média de fluorescência (MFI). A MFI é calculada por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência. Após as 48h de incubação com as NV, foi observado um aumento do valor de MFI em células de câncer FITC⁺ quando comparado com seu grupo controle (células que não foram expostas às NV-FITC). Foi notado um aumento da MFI com o aumento da concentração de NV. Este aumento em relação ao grupo controle, cuja MFI representa a autofluorescência das células, indica que as NV foram internalizadas pelas células tumorais. Esses resultados indicam o potencial dos sistemas como sistemas antitumorais. Nessas condições, quanto maior a internalização das NV pelas células tumorais, melhor será o resultado do tratamento, pois o CTX será entregue em maior quantidade e de forma efetiva ao sítio tumoral. A maior internalização foi verificada com a concentração de 10^8 partículas/ml de NV-FITC (Figura 4), com aumento de 23% da MFI em relação ao grupo controle, sendo adotada como concentração ideal para encapsulamento do fármaco.

Além da citometria de fluxo, foram realizadas imagens de microscopia de fluorescência confocal para verificar a interação das NV com as células tumorais (Figura 5).

As imagens foram feitas após um período de 48h de incubação das células com as NV marcadas.

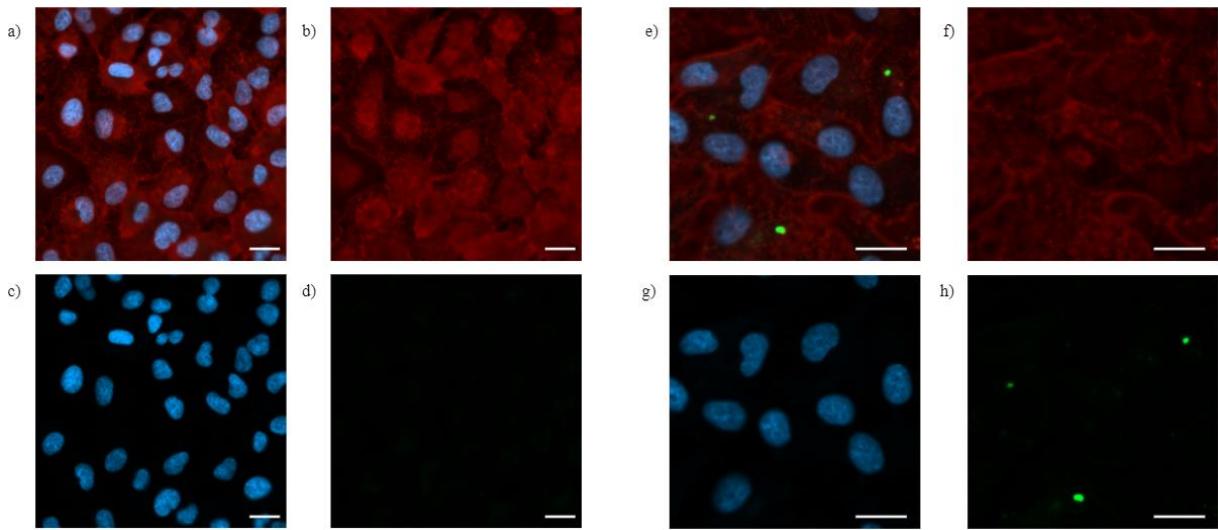


Figura 5 - Microscopia de fluorescência confocal de células de carcinoma pulmonar (linhagem A549). A membrana celular foi marcada com Texas Red (vermelho), o núcleo com DAPI (azul) e as nanovesículas com FITC (verde). Foram separados os canais de marcação para melhor visualização das células sem (a-d) e com (e-h) incubação de nanovesículas. Em (b) e (f) está representado o canal do marcador Texas Red, em (c) e (g) o canal do DAPI e em (d) e (h) o canal de FITC. Em (a) e (e) está representada a sobreposição dos três canais (barra de escala = 20 μ m).

Fonte: Elaborada pela autora

A presença das NV foi evidenciada na Figura 5-h, na qual podemos observar a presença das NV-FITC coradas em verde. A Figura 5-e sugere que houve internalização das NV pelas células tumorais, com as NV FITC⁺ presentes no citoplasma celular.

3.3 Ensaios *in vitro* de viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular antes e após o tratamento com o CTX foi realizado um ensaio de MTT (brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). A fim de determinar a melhor concentração de quimioterápico para morte celular, foram testadas concentrações variando entre 5 e 10000 ng/ml, avaliando também sua eficiência em 24h e 48h (Figura 6).

A concentração de 500 ng/ml de CTX causou maior morte celular em ambos os períodos de tempo estudados, mesmo quando comparada às concentrações maiores do quimioterápico. No entanto, para essa concentração foi observado um aumento da viabilidade celular, com 48% em 24h e de 56% em 48h de incubação, indicando a retomada do crescimento celular tumoral após o período inicial de tratamento. Esta retomada do crescimento é desfavorável, pois indica que o efeito antitumoral do fármaco foi temporário e

insuficiente para redução significativa da viabilidade das células tumorais. Dentre as concentrações estudadas, a de 500 ng/ml do quimioterápico foi a que mostrou melhores resultados quanto à morte celular, sendo então adotada como a concentração ideal para o tratamento. Os resultados foram analisados considerando que 100% das moléculas de CTX foram encapsuladas pelas NV de membrana.

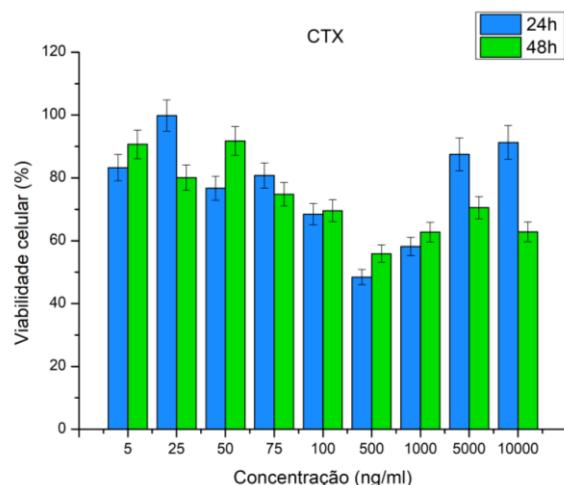


Figura 6 - Ensaio de viabilidade celular para células de carcinoma pulmonar após tratamento com cabazitaxel (CTX) em 24h e 48h de incubação. Gráfico de barras de concentração (partículas/ml) x viabilidade celular (%).

Fonte: Elaborada pela autora

Em seguida foi feito o ensaio de MTT com as NV puras e carregadas CTX, ambas na concentração de 10^4 a 10^8 partículas/ml, para os períodos de 24h e 48h (Figura 7). Para o tratamento com as NV vazias, aparentemente, não foram verificadas redução na viabilidade das células tumorais, para ambos os períodos de tempo (24 e 48 h), com aumento do crescimento celular para período de 48h de incubação.

Para NV-CTX, para ambos os períodos (24 e 48 h) verificou-se uma maior citotoxicidade na concentração de 10^8 partículas/ml. A redução da viabilidade foi visivelmente maior no período de 48h (Figura 7).

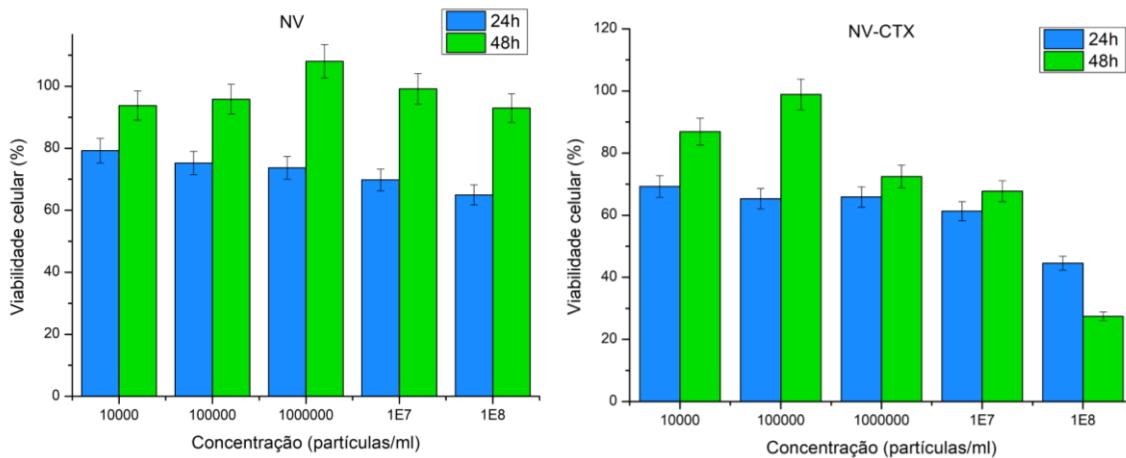


Figura 7 - Ensaio de viabilidade celular para células de carcinoma pulmonar após tratamento com nanovesículas vazias (NV) e nanovesículas com quimioterápico (NV-CTX) em 24h e 48h de incubação. Gráfico de barras de concentração (partículas/ml) x viabilidade celular (%).

Fonte: Elaborada pela autora

Em 48h, a viabilidade das células expostas à 10^8 partículas/ml de NV-CTX foi reduzida em cerca de 75%. Para essa concentração também foi observado uma diminuição de aproximadamente 20% da viabilidade celular entre os períodos de 24h e 48h de incubação, com maior morte celular em 48h. Este resultado pode indicar uma ação prolongada do tratamento, uma vez que não houve retomada do crescimento celular tumoral observado em células que receberam o tratamento com o quimioterápico puro.

Como complemento do ensaio de atividade metabólica, foram realizados experimentos de morte celular induzida por apoptose e/ou necrose, a partir da marcação de Anexina-V e 7AAD, por citometria de fluxo. A anexina V é um composto conjugado com ficoeritrina (PE), que se liga aos fosfolipídios presentes na parte interna da membrana celular. Células em processo de apoptose sofrem alteração conformacional de sua membrana, de forma a expor os fosfolipídios, facilitando a ligação com a anexina V e, assim, permitindo a identificação dessa marcação para quantificação das células em apoptose. O 7AAD é um produto marcado com PerCP, o qual apresenta fluorescência em células que sofrem lise osmótica através dos poros formados na superfície, permitindo quantificar as células que sofreram necrose. Desse modo, a marcação de células com esses reagentes, seguida de leitura em citômetro de fluxo, permite a quantificação de células em apoptose e/ou necrose.

Três concentrações diferentes (10^6 , 10^7 e 10^8 partículas/ml) foram investigadas para as NV puras (NV), carregadas com CTX (NV-CTX), e CTX puro nas concentrações equivalentes. As análises foram realizadas em um período de 48h.

Para avaliar o efeito do CTX puro, as células tumorais foram incubadas com CTX, nas concentrações de 5, 50 e 500 ng/ml, o que corresponde à 10^6 , 10^7 e 10^8 partículas/ml de NV-

CTX, respectivamente. As análises foram realizadas por um período de 48h e os resultados estão apresentados na Figura 8.

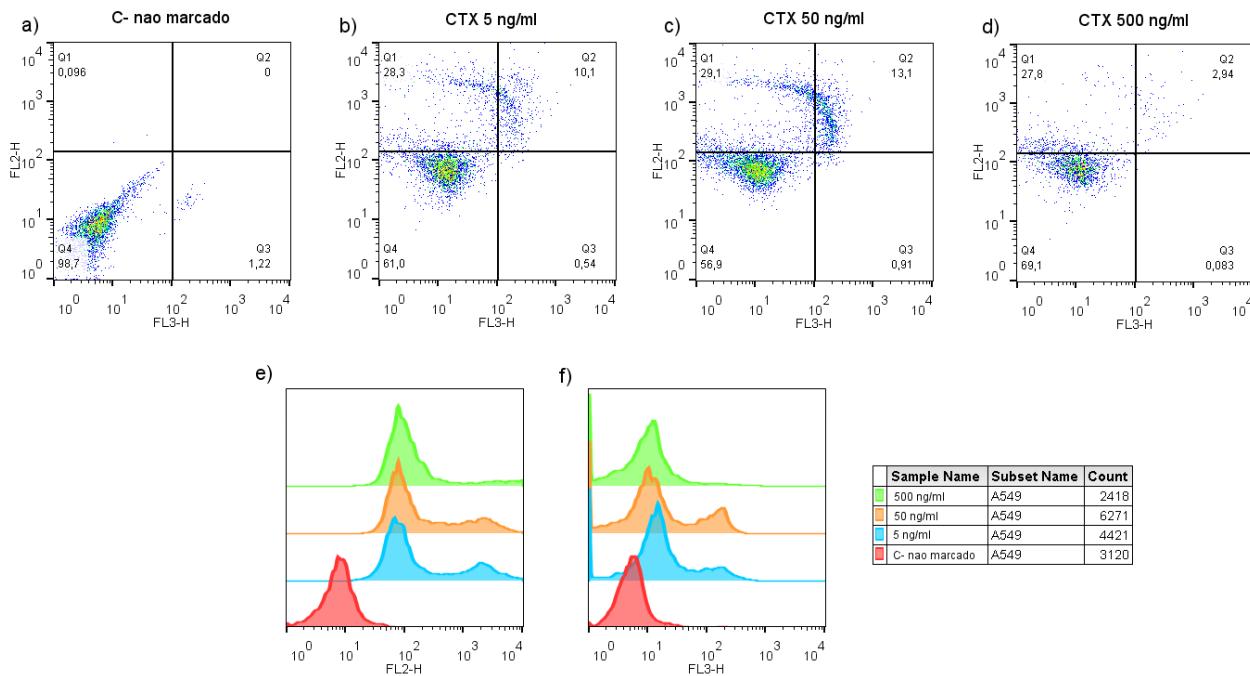


Figura 8 - Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em células de carcinoma pulmonar tratadas com diferentes concentrações de quimioterápico. Em (a), (b), (c) e (d), gráficos *dotplot* de morte celular por apoptose (FL2-H) x necrose (FL3-H) de células tumorais incubadas com cabazitaxel (CTX) por um período de 48h. Os histogramas representam a morte celular por apoptose (e) e necrose (f) de acordo com a fluorescência de seus respectivos marcadores.

Fonte: Elaborada pela autora

Todas as concentrações apresentaram um desempenho similar, com aproximadamente 30% das células sofrendo morte por apoptose. Adicionalmente, a Figura 8 mostra que a maior parte das células tumorais sofreram morte por apoptose.

A morte celular pode ocorrer de diversas formas, sendo as principais a apoptose e a necrose. A morte celular por necrose é um processo não controlado, no qual as células são incapazes de funcionar, e como resultado da disruptão de homeostase, elas incham até que haja ruptura da membrana. Já a apoptose é um processo de morte celular controlada, com interrupção do crescimento e divisão celular. (32) Os resultados obtidos com CTX puro são coerentes, já que CTX é um fármaco que atua como inibidor de microtúbulos, ou seja, ele se liga à tubulina de forma a impedir a desmontagem dos microtúbulos. (33) A estabilização de microtúbulos interfere no processo de mitose e interfase, impedindo a dinâmica da divisão celular, levando a célula à apoptose.

O mesmo fenômeno foi observado no tratamento com NV-CTX, onde houve uma predominância de morte celular por apoptose nas três concentrações estudadas (Figura 9).

Dada a predominância de morte celular por apoptose no tratamento com NV-CTX, verificou-se que o encapsulamento do CTX aumentou o desempenho do antitumoral. Diversos estudos têm mostrado que o encapsulamento de dois ou mais quimioterápicos em NV podem atuar de forma complementar, ou seja, em diferentes mecanismos de ação para indução de morte celular, aumentam os efeitos citotóxicos do tratamento em células tumorais. (34)

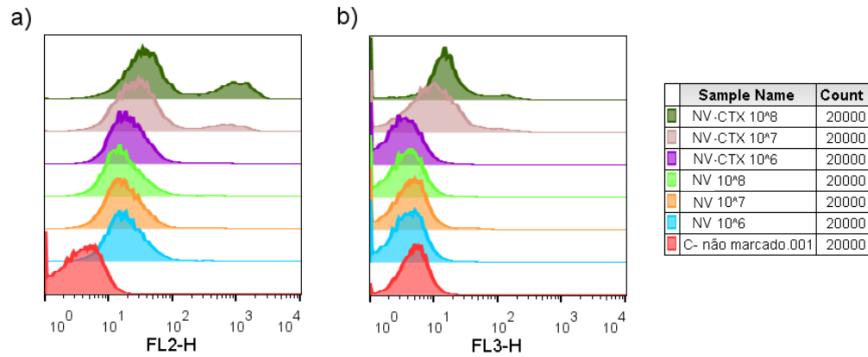


Figura 9 - Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em células de carcinoma pulmonar incubadas por 48h com diferentes concentrações de nanovesículas, com e sem quimioterápico cabazitaxel. Os histogramas representam a morte celular por apoptose (a) e necrose (b) de acordo com a fluorescência de seus respectivos marcadores.

Fonte: Elaborada pela autora

Após analisar a morte celular nas três concentrações estudadas de NV-CTX, melhores resultados foram demonstrados utilizando-se 10^8 partículas/ml (Figura 10). Nessa concentração, aproximadamente 50% das células tumorais sofreram algum tipo de morte, sendo 40% delas por apoptose e 8% por necrose e apoptose, simultaneamente.

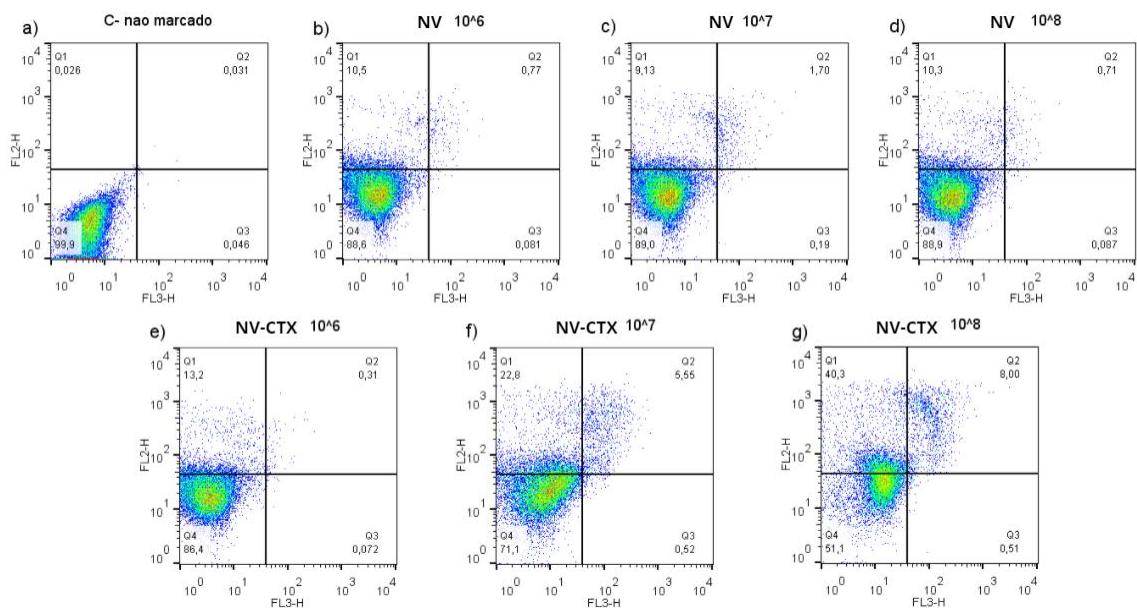


Figura 10 - Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em células de carcinoma pulmonar incubadas por 48h com diferentes concentrações de nanovesículas, com e sem quimioterápico cabazitaxel. Gráficos dotplot de morte celular por apoptose (FL2-H) x necrose (FL3-H).

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 10 mostra um comparativo entre os sistemas estudados. A morte celular após tratamento com NV-CTX (10^8 partículas/ml) foi maior quando comparado com CTX puro (500 ng/ml), em 48h de estudo. Este resultado está de acordo com o que foi observado nos ensaios de MTT, no qual o percentual de células vivas foi menor usando 10^8 partículas/ml de NV-CTX. Estes resultados sugerem que o tratamento com NV-CTX pode ser potencialmente mais eficaz do que o CTX puro. A ação prolongada do tratamento, juntamente com a especificidade da interação NV-célula conferida pelos componentes de sua superfície, confere vantagens para a utilização das NV biomiméticas no tratamento do carcinoma pulmonar humano.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento racional de NV, explorando tecnologias que preservam estruturas celulares presentes nas membranas representa um grande avanço na ciência e pode trazer novas possibilidades para uso na terapia anticâncer.

Neste estudo, foi desenvolvida uma nova plataforma nanotecnológica baseada na formação de NV a partir da membrana plasmática de linhagens de A549. As NV biomiméticas foram carregadas com CTX, um fármaco já utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, e o potencial antitumoral dos sistemas foi avaliado através de estudos *in vitro*. O desenvolvimento de um sistema biomimético é particularmente interessante, pois possui elevada biocompatibilidade com as células alvo. As NV desenvolvidas apresentaram diâmetro (< 200 nm) e potencial zeta (~ -12 mV) demonstrando a adequabilidade do sistema para internalização celular. A caracterização dos sistemas demonstrou que as NV possuem propriedades físico-químicas, como morfologia, compatíveis entre componentes que podem contribuir para a estabilidade dos sistemas no ambiente fisiológico. A internalização celular das NV foi demonstrada pelas técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal, onde as NV foram co-localizadas no citoplasma das células tumorais. A atividade antitumoral em células de carcinoma pulmonar (A549) foi demonstrada pelos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, que mostrou que a incorporação do CTX nas NV aumentou a efetividade do fármaco, prolongando sua ação. Esses resultados foram complementados com os ensaios de apoptose/necrose, onde verificou-se que NV-CTX (10^8 partículas/ml) apresentaram maior efetividade (maior morte celular) em relação ao CTX puro. Além disso, foi observada uma predominância de morte por apoptose, que também se deve ao mecanismo de ação do fármaco, que atua na inibição da dinâmica dos microtúbulos.

O conjunto de resultados evidenciaram que o encapsulamento do CTX em NV biomiméticas é essencial para garantir a biossegurança e potencializar sua atividade antitumoral, o que mostra o potencial dos sistemas para liberação específica do CTX nas células tumorais. Futuros estudos serão dedicados a fim de obter confirmação estatística dos resultados e avaliar o perfil de liberação do fármaco a partir dos nanocarreadores, além dos ensaios *in vitro* em células de linhagem celular saudável para investigar a especificidade do tratamento.

REFERÊNCIAS

- 1 BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018
- 2 SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- 3 MULSHINE, J. L. Screening for lung cancer: in pursuit of pre-metastatic disease. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 65–73, 2003. DOI: 10.1038/nrc972.
- 4 RODRIGUEZ-CANALES, J.; PARRA-CUENTAS, E.; WISTUBA, I. I. Diagnosis and molecular classification of lung cancer. *Cancer Treatment and Research*, v. 170, p. 25-46, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-40389-2_2.
- 5 DEVITA, H. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S A. *Cancer: principles & practice of oncology*. Philadelphia: LWW, 2015.
- 6 VRIGNAUD, P. *et al.* Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors. *Clinical Cancer Research*, v. 19, n. 11, p. 2973–2983, 2013
- 7 GALSKY, M. D. *et al.* Cabazitaxel. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9 n. 9, p. 677–678, 2010.
- 8 CORN, P G. Cabazitaxel plus carboplatin for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancers: a randomised, open-label, phase 1-2 trial *Lancet Oncology*, v. 20, n. 10, p. 1432–432019. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30408-5.
- 9 PIVOT, X. *et al.* A multicenter phase II study of XRP6258 administered as a 1-h i.v. infusion every 3 weeks in taxane-resistant metastatic breast cancer patients *Annals of Oncology*, v. 19, n. 9, p. 1547–1552, 2008.
- 10 MADSEN, C. V. *et al.* Cabazitaxel - a treatment option in recurrent platinum-resistant ovarian cancer. *Anticancer Research*, v. 40, 9, p. 5255–5261, 2020
- 11 SCHMALENBERG, H. *et al.* CabaGast: multicentre, phase II study with cabazitaxel in previously treated patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the esophagogastric junction and stomach. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 144, n. 3, p. 559–569, 2018.
- 12 KOTSAKIS, A. *et al.* A multicentre phase II trial of cabazitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer progressing after docetaxel-based chemotherapy. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 7, p. 784–788, 2016.
- 13 ABU LILA, A. S.; ISHIDA, T. Metronomic chemotherapy and nanocarrier platforms. *Cancer Letters*, v. 400, p. 232–242, 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.007
- 14 CAI, X-J. *et al.* Combination of metronomic administration and target delivery strategies to improve the anti-angiogenic and anti-tumor effects of triptolide. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 10, n. 1, p. 93–107, 2020.

- 15 SHU, Y.; WENG, S.; ZHENG, S. Metronomic chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, v. 20, p. 307, 2020. DOI: 10.3892/ol.2020.12170.
- 16 ERNSTING, M. J. *et al.* Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 172, n. 3, p. 782–794, 2013.
- 17 DUAN, X. *et al.* Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *Wiley interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 8, n. 5, p. 776–91, 2016.
- 18 NGHIEM, T. H. L. *et al.* Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins *Advances in Natural Sciences: nanoscience and nanotechnology*, v. 1, n. 2, p. 025009, 2010.
- 19 PARODI, A. *et al.* Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nature Nanotechnology*, v. 8, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1038/nnano.2012.212.
- 20 WU, T. *et al.* Biomimetic nanovesicles for enhanced antitumor activity of combinational photothermal and chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics*, v. 15, n. 3, p. 1341–1352, 2018.
- 21 KROLL, A. V.; FANG, R. H.; ZHANG, L. Biointerfacing and applications of cell membrane-coated nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 23–32, 2017.
- 22 VIJAYAN, V.; UTHAMAN, S.; PARK, I-K. Cell membrane-camouflaged nanoparticles: a promising biomimetic strategy for cancer theragnostics. *Polymers*, v. 10, n. 9, p. 983, 2018.
- 23 DEHAINI, D. *et al.* Erythrocyte-platelet hybrid membrane coating for enhanced nanoparticle functionalization. *Advanced Materials*, v. 29, n. 16, 2017. DOI: 10.1002/adma.201606209.
- 24 FARAHANI, E. *et al.* Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 4, p. 747–59, 2014.
- 25 KIM, A. Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-38915-x.
- 26 FOROOZANDEH, P.; AZIZ, A. A. Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, v.13, n. 1, p. 339, 2018.
- 27 STRACHAN, J. B. *et al.* Toxicity and cellular uptake of lipid nanoparticles of different structure and composition. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 576, p. 241–251, 2020. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.05.002.
- 28 KUHAR, N. *et al.* Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. *RSC Advances*, v. 8, n. 46, p. 25888–25908, 2018.
- 29 XUE, L. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for tumor stages detection and histologic grades classification of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, v. 13, p. 4977–4986 2018. DOI: 10.2147/IJN.S167996.

- 30 BUKOWSKA, J. On the assignment of the NH₂ stretching modes in the vibrational spectrum of formamide. *Spectrochimica Acta Part A: molecular spectroscopy*, v. 35, p. 985–988, 1979. DOI: 10.1016/0584-8539(79)80023-9.
- 31 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary. *Cabazitaxel*. 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cabazitaxel>. Acesso em: 23 set. 2021.
- 32 D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, v. 43, 6, p. 582–92, 2019.
- 33 JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 253–265, 2004. DOI:10.1038/nr1317.
- 34 COMPARETTI, E. 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