

Título em Português:	Ação de gemcitabina e paclitaxel transportado por nanocarreadores lipídicos para modulação de células tumorais e imunocompetentes
Título em Inglês:	effects of gemcitabine and paclitaxel delivery by cell membrane-derived nanoparticles on pancreatic cancer cells and monocytes
Autor:	João Victor Brandão Quitiba
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Valtencir Zucolotto
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Materiais Não-Metálicos
Agência Financiadora:	FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

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

João Victor Brandão Quitiba

Valtencir Zucolotto

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

jquitiba@usp.br

Objetivos

Desenvolver uma nanoestrutura capaz de carrear agentes antineoplásicos as células tumorais e de modular positivamente a ação de células apresentadoras de antígenos. Desta forma, nanopartículas foram sintetizadas por lipídeos e proteínas extraídos da membrana de célula tumoral para testar a eficiência do transporte simultâneo de antígenos tumorais e quimioterápicos para células imunocompetentes e células de carcinoma pancreático humano, respectivamente.

Métodos e Procedimentos

Síntese das nanopartículas (MNPs): Membranas de células de carcinoma pancreático foram isoladas e purificadas por ultracentrifugação e reconstruídas como vesículas por extrusão. A incorporação de gemcitabina (GEM) e paclitaxel (PTX) as MNPs (MNPs-GEM e MNPs-PTX) foi preparada a partir da mistura das soluções e submetida à extrusão por uma membrana de 100 nm.

Caracterização: Foi realizada espectroscopia no UV-Vis para acompanhar a cinética de formação das nanopartículas e estimar a quantidade de quimioterápico conjugado nas MNPs. Foram também realizadas medidas de espalhamento de luz e potencial zeta dos nanomateriais em suspensão, a fim de se obter informações sobre polidispersividade, distribuição de tamanho e potencial de superfície. A concentração da solução de nanopartículas foi obtida por NTA (em inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis*) e a morfologia das mesmas foi obtida por microscopia de força atômica.

Ensaio de citotoxicidade: Para testar a

especificidade, os nanocarreadores foram expostos às células PANC-1 (tumor pancreático humano) e células HEPA-RG (linhagem celular hepática de fenótipo saudável). A atividade citotóxica da droga imobilizada foi testada por exposição in vitro de células alvo aos nanocarreadores e posterior análise da capacidade de redução de metil tetrazólio (MTT) e citometria de fluxo.

Ensaio de interação: A adesão/internalização foi analisada através de citometria de fluxo. As MNPs foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e utilizadas para verificar a incorporação das MNPs por células mononucleares (monócitos), células de câncer pancreático (PANC-1) e células hepáticas saudáveis (HEPA-RG).

Resultados

No presente estudo, foram conduzidos trabalhos com o objetivo de sintetizar e caracterizar as nanopartículas de membrana plasmática de células de carcinoma pancreático (PANC-1) conjugadas com dois quimioterápicos de primeira linha (Paclitaxel e Gemcitabina). As análises de rastreamento de nanopartículas (NTA) e imagens de microscopia de Força Atômica (AFM) revelaram nanopartículas lipídicas monodispersas em solução com tamanho médio entre 100-200 nm e o potencial zeta negativo em todos os grupos experimentais. Testes de estabilidade em meio biológicos demonstraram aumento no tamanho médio e redução na carga superficial das nanopartículas após 48h de exposição. Também definimos a concentração de trabalho (10^9 partículas/ml) a serem utilizadas nos experimentos de citotoxicidade (MTT) e futuros

ensaios de viabilidade celular. A concentração de partículas foi definida a partir daquela que produziu resultados estatisticamente diferentes entre os grupos de nanoestruturas carregando gemcitabina e paclitaxel.

Foram conduzidos experimentos de citotoxicidade (MTT) a fim de verificar a eficiência da combinação de MNPs-GEM e MNPs-PTX aplicadas simultaneamente em diferentes proporções. Essa análise nos mostrou que nanopartículas conjugadas apenas com um quimioterápico e combinadas entre si em diferentes proporções não apresentam diferenças quanto a ação citotóxica. Quando comparadas a outras análises realizadas em nosso grupo, concluímos que nanopartículas conjugadas com ambos os quimioterápicos apresentam uma melhor ação citotóxica em células tumorais.

Também foram realizados estudos para testar a especificidade dos nanocarreadores fabricados com membranas celulares da linhagem PANC-1 uma linhagem hepatocelular saudável (HEPA-RG), uma pancreática carcinogênica (PANC-1) e monócitos. Para isso, foi realizado uma análise de adesão/internalização através de citometria de fluxo e um ensaio de apoptose/necrose, realizado pela marcação com anexina V (apoptose) e 7AAD+ (necrose), que confirmou a maior toxicidade das MNPs complexada com gemcitabina e com paclitaxel do que os quimioterápicos puros. Foi observado que nanopartículas sintetizadas com os principais componentes da membrana plasmática da célula neoplásica aumentam a internalização dos quimioterápicos acarretando em um maior índice de morte celular (anexina V+/7AAD+). Foi realizada a marcação das nanopartículas com FITC que nos permitiu observar, na linhagem PANC-1, sua interação com as células tumorais. Fundamentalmente, as MNPs interagem com maior frequência na linhagem celular da qual foi extraída a membrana, favorecendo a entrega dos quimioterápicos e, consequentemente, tornando sua ação mais eficaz. Analisando a indução de apoptose nas células tratadas com as nanopartículas, e marcadas com Anexina e 7AAD, observamos que a combinação de MNPs-GEM e MNPs-PTX induz maior índice de morte celular do que MNPs-GEM, demonstrando maior

efetividade na presença de uma agente estabilizador de microtúbulos.

Conclusões

Foi desenvolvida uma nanoestrutura com os principais componentes da membrana plasmática derivada de células de carcinoma pancreático (PANC-1) e conjugada com baixas doses de GEM e PTX. 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 transportadores eficientes de quimioterápicos para células de câncer pancreático, produzindo efeitos citotóxicos superiores do que a quimioterapia pura 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 Bibliográficas

- [1] 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.
- [2] 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.

Effects of gemcitabine and paclitaxel delivery by cell membrane-derived nanoparticles on pancreatic cancer cells and monocytes

João Victor Brandão Quitiba

Valtencir Zucolotto

Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo

jquitiba@usp.br

Objectives

Development of a nanostructure able to carry antineoplastic agents to tumor cells and to positively modulate the action of antigen-presenting cells. Thus, nanoparticles were synthesized by lipids and proteins extracted from tumor cell membrane to test the efficiency of simultaneous transport of tumor antigens and chemotherapeutics to immunocompetent cells and human pancreatic carcinoma cells, respectively.

Materials and Methods

Synthesis of nanoparticles (MNPs):

Pancreatic carcinoma cell membranes were isolated and purified by ultracentrifugation and reconstructed as vesicles by extrusion. The incorporation of gemcitabine (GEM) and paclitaxel (PTX) MNPs (MNPs-GEM and MNPs-PTX) was prepared from the mixture of the solutions and subjected to extrusion through a 100 nm membrane.

Characterization: UV-Vis spectroscopy was performed to follow the formation kinetics of nanoparticles and estimate the amount of chemotherapeutic agent conjugated in MNPs. dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements of the nanomaterials in suspension were also performed to obtain information about polydispersity, size distribution and surface potential. The nanoparticle solution concentration was obtained by nanoparticle tracking analysis (NTA) and their morphology was obtained by

atomic force microscopy.

Cytotoxicity assays: To test the specificity, the nanocarriers were exposed to PANC-1 cells (human pancreatic tumor) and HEPA-RG cells (liver cell line of healthy phenotype). The cytotoxic activity of the immobilized drug was tested by in vitro exposure of target cells to the nanocarriers and subsequent analysis of methyl tetrazolium reduction capacity (MTT) and flow cytometry.

Interaction assays: Adhesion/internalisation was analysed by flow cytometry. MNPs were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and used to verify the incorporation of MNPs by mononuclear cells (monocytes), pancreatic cancer cells (PANC-1) and healthy liver cells(HEPA-RG).

Results

In the present study, assays were conducted to synthesize and characterize plasma membrane nanoparticles of pancreatic carcinoma cells (PANC-1) conjugated with two first-line chemotherapeutics (Paclitaxel and Gemcitabine). Nanoparticle tracking analysis (NTA) and Atomic Force Microscopy (AFM) images revealed monodispersed lipid nanoparticles in solution with an average size between 100-200 nm and the negative zeta potential in all experimental groups. Stability tests in biological media showed increase in the average size and reduction in the surface charge of the nanoparticles after 48h of exposure. We also defined the working concentration (10^9 particles/ml) to be used in

cytotoxicity experiments (MTT) and future cell viability assays. The particle concentration was defined from the one that produced statistically different results between the groups of nanostructures carrying gemcitabine and paclitaxel.

Cytotoxicity experiments (MTT) were conducted in order to verify the efficiency of the combination of MNPs-GEM and MNPs-PTX applied simultaneously in different proportions. This analysis showed that nanoparticles conjugated only with a chemotherapeutic agent and combined with each other in different proportions do not present differences regarding cytotoxic action. When compared to other analyses performed in our group, we concluded that nanoparticles conjugated with both chemotherapeutics present a better cytotoxic action on tumor cells.

Studies were also performed to test the specificity of the manufactured nanocarriers with cell membranes of PANC-1 a healthy hepatocellular cell line (HEPA-RG), a pancreatic carcinogenic cell line (PANC-1) and monocytes. To this end, an adhesion/internalization analysis was performed by flow cytometry and an apoptosis/necrosis assay, performed by annexin V (apoptosis) and 7AAD+ (necrosis) labeling, which confirmed the higher toxicity of MNPs complexed with gemcitabine and with paclitaxel than pure chemotherapeutics. It was observed that nanoparticles synthesized with the main components of the plasma membrane of neoplastic cells increase the internalization of chemotherapeutic agents leading to a higher rate of cell death (annexin V+/7AAD+). The nanoparticles were labeled with FITC, which allowed us to observe their interaction with tumor cells in the PANC-1 lineage. Fundamentally, MNPs interact more frequently in the cell lineage from which the membrane was extracted, favoring the delivery of chemotherapeutic agents and, consequently, making their action more effective. Analyzing the induction of apoptosis in cells treated with nanoparticles and labeled with Annexin and 7AAD, we observed that the combination of MNPs-GEM and MNPs-PTX induces higher rate of cell death than MNPs-GEM, demonstrating greater effectiveness in the presence of a microtubule stabilizing agent.

Conclusions

A nanostructure was developed with the main components of plasma membrane derived from pancreatic carcinoma cells (PANC-1) and conjugated with low doses of GEM and PTX. Physicochemical analyses showed particles were stable in culture medium and able to effectively deliver drugs. Our studies revealed that MNPs are efficient transporters of chemotherapeutics to pancreatic cancer cells, producing higher cytotoxic effects than pure chemotherapy and showing no cytotoxicity in healthy liver cells (HEPA-RG). It was also observed that different ratios of distinct drug-containing nanoparticles do not show a difference in nanoparticle efficacy when compared to nanoparticles containing both chemotherapeutics. Apoptosis/necrosis assays showed that the combination of MNP-GEM with PTX favors cytotoxic activity in pancreatic neoplastic cells and not in healthy liver cells. Finally, our results contribute to the understanding of the application of MNPs as nanocarriers of antineoplastic agents and their effects in pancreatic cancer, in healthy cells and initiating studies to observe interactions with immunocompetent cells.

References

- [1] 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.
- [2] 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.