



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022005434-7 A2

(22) Data do Depósito: 23/03/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
03/10/2023

(54) Título: PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DESTA E USO DA PLATAFORMA

(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 33/242; A61K 35/13; A61K 35/15; A61P 35/00.

(52) CPC: A61K 9/5184; A61K 33/242; A61K 35/13; A61K 35/15; A61P 35/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTO; PAULA MARIA PINCELA LINS; LAÍS RIBOVSKI; JULIANA CANCINO BERNARDI; LUANA CORSI ANTONIO.

(57) Resumo: PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DESTA E USO DA PLATAFORMA. A presente invenção refere-se a uma plataforma nanoestruturada revestida com vesículas extracelulares e/ou membranas celulares para aplicação em terapia fototérmica. A nanopartícula da invenção compreende a) um núcleo interno constituído de um nanomaterial plasmônico, como nanobastões de ouro; e b) uma superfície externa elaborada de vesículas extracelulares e/ou membranas celulares derivadas de célula de macrófago. A presente invenção descreve um método para fabricação da plataforma nanoestruturada. Além disso, é descrito o uso da plataforma nanoestruturada em conjunto com um fármaco antitumoral na fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer.

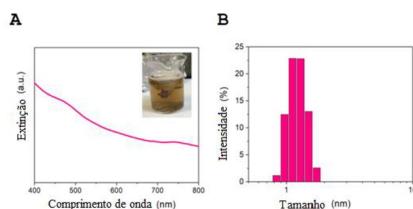


Figura 1

PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER,**MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DESTA E USO DA PLATAFORMA****CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se a uma plataforma nanoestruturada revestida com vesículas extracelulares e/ou membranas celulares para aplicação em terapia fototérmica. A nanopartícula da invenção compreende a) um núcleo interno constituído de um nanomaterial plasmônico, logo, sem origem celular; e b) uma superfície externa, elaboradas de vesículas extracelulares e/ou membranas celulares derivadas de célula de macrófago. A invenção fornece métodos de desenvolvimento e seu uso para tratar doenças originadas em ambiente celular como o câncer.

[002] O principal objetivo foi desenvolver sistemas específicos para tratamento de câncer utilizando as propriedades de direcionamento ativo das vesículas extracelulares e/ou membranas celulares combinadas com as propriedades de ótica não linear e fototérmicas das nanopartículas plasmônicas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[003] Nanopartículas plasmônicas são nanomateriais de metais nobres, que além das suas propriedades catalíticas, possuem o efeito de ressonância plasmônica de superfície (RPS). Quando uma nanopartícula metálica é exposta a uma onda eletromagnética, há uma oscilação coerente dos elétrons da banda de condução em ressonância com a frequência da luz. A frequência da RPS, assim como a intensidade da banda, é dependente de fatores como a densidade de carga eletrônica na superfície, o tamanho, o formato e a constante dielétrica do meio. Assim, uma característica notável dessa classe de

materiais é a versatilidade na qual as propriedades óticas podem ser modificadas por meio do tamanho, formato e composição ampliando o uso em diversas aplicações.

[004] Na área de biomedicina há o desenvolvimento de nanopartículas plasmônicas para contraste de imagens e também como agentes terapêuticos, em decorrência das propriedades de espalhamento de luz. O contraste de imagens em células tumorais ocorre por meio de diversas técnicas óticas, como por exemplo, microscopia de campo escuro, fluorescência por dois fôtons (Durr, N. J. et al., 2007), espalhamento de Raman e imagem fotoacústica (Cai, X. et al., 2011). A ação terapêutica é baseada na irradiação externa de luz, na qual os nanomateriais convertem esse estímulo em calor, podendo ser utilizado para a liberação controlada de fármacos e para terapia fototérmica plasmônica (de Aberasturi, D. J. et al., 2015). Além da alta estabilidade, o uso dessas nanopartículas como agentes fototérmicos melhora a absorção de luz do infravermelho próximo quando comparados com agentes de fototerapias convencionais. Outra vantagem que auxilia a aplicação desses nanomateriais é o efeito de permeabilidade e retenção (EPR), no qual tais nanomateriais se acumulam mais em locais tumorais quando comparados com pequenas moléculas (Maeda, H. et al., 2009).

[005] Nanomateriais baseados em ouro têm se destacado devido às suas propriedades plasmônicas combinadas com alta estabilidade e baixa toxicidade. Dentre essas nanoestruturas, as em formato de bastão, chamadas de nanobastões (*nanorods*) são interessantes uma vez que a banda de ressonância de superfície plasmônica é dividida em duas bandas quando comparada a nanopartículas de ouro, decorrente

do movimento coerente da banda de condução dos elétrons ao longo dos dois sentidos da partícula. A banda transversal ocorre na região visível, enquanto que a banda longitudinal ocorre perto da região do infravermelho (Pérez-Juste, J. et al., 2005; Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. a., 2003a; Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. a., 2003b). Enquanto a banda transversal não é dependente do tamanho dos nanobastões, a banda longitudinal é transladada da região do visível para o infravermelho próximo, com o aumento da razão de aspecto (comprimento/largura) (Huang, B. X. et al., 2009).

[006] Apesar do efeito EPR, ainda menos de 1% da dose administrada de nanomateriais atinge o tumor sólido (Bisso, S. & Leroux, J. C., 2020; Wilhelm, S. et al., 2016). Quando um nanomaterial é administrado no corpo, ele encontra várias interfaces complexas que possuem mecanismos para eliminar corpos estranhos (Nel, A. E. et al., 2009). Por exemplo, quando na corrente sanguínea as proteínas são absorvidas na superfície das nanopartículas e podem comprometer seu desempenho (Salvati, A. et al., 2013). Portanto, a biomimetização eficiente dos nanomateriais é uma etapa importante para uma tradução bem-sucedida *in vivo* (Fang, R. H. et al., 2018).

[007] A biomimetização de nanopartículas usando substratos naturais ligados a membranas permite aplicações além dos tratamentos tradicionais. A principal hipótese da abordagem é que as nanopartículas funcionalizadas com membrana celular herdam as propriedades das células de origem. Como um exemplo, os nanomateriais revestidos com membrana celular de glóbulos vermelhos conferem o tempo de circulação prolongado e as nanopartículas baseadas em

membranas de células cancerosas visam ativamente os locais do tumor por ligação homotípica (Hu, C.-M. J. et al., 2011; Chen, Z. et al., 2019; Sun, H. et al., 2016; Jin, J. et al., 2016).

[008] O revestimento de vesículas extracelulares (EVs) tem se tornado uma abordagem valiosa para aumentar o tempo de circulação, os locais de tumor alvo e modular o microambiente tumoral (Tkach, M. & Théry, C., 2016; Kanada, M. et al., 2015; Nie, W. et al., 2020; Lara, P. et al., 2020; Kamerkar, S. et al., 2017; Lara, P. et al., 2020; Yuan, L. et al., 2019). As EVs são conhecidas por serem carreadores de comunicação entre as células, e dependendo de suas células de origem possuem atributos (Kanada, M. et al., 2015). Estes portadores ligados à membrana são classificados por seu tamanho, como vesículas extracelulares pequenas (50-200 nm), médias (200-1000 nm) e grandes (1-10 μ m) (Théry, C. et al., 2018). Na classe pequena, eles se originam de duas formas: por liberação endossômica (exossomos) ou membranas plasmáticas (microvesículas) (Antonyak, M. A. & Cerione, R., 2015).

[009] Diante deste cenário, a presente invenção teve como avanço a expansão da síntese e caracterização de nanomateriais. Para isso, vesículas extracelulares e membranas celulares isoladas das células de macrófagos (RAW264.7) foram usadas para recobrir os nanobastões de ouro por meio de extrusão mecânica. Nas análises de caracterização mostrou-se que houve o recobrimento eficiente e com propriedades fototérmicas. Ensaios *in vitro* mostraram que o sistema foi capaz de ser internalizado por células cancerígenas e células do microambiente tumoral.

[010] Hu et al. (2008) foram os primeiros que recobriram nanopartículas poliméricas com membranas de hemácias e mostraram que esse nanomaterial possui um tempo de circulação superior se comparado com nanopartículas recobertas com poli(etileno glicol) (PEG), que é o polímero mais utilizado para estender o tempo de circulação de nanomateriais no organismo. Esses autores patentearam o sistema formado por nanopartículas poliméricas como poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL), poli-lisina e poli(ácido glutâmico) recobertas com membranas celulares derivadas de células do sangue, tumorais, do sistema imune, vesículas extracelulares e células tronco (US 20130337066 A1). Mais tarde, os autores reivindicaram o uso de nanopartículas recobertas com membrana de células do sangue para o tratamento de doenças hemolíticas e para a transfusão de sangue (WO2015187502 A1 e WO2016109306 A1).

[011] Marangoni et al. (2019) desenvolveram nanobastões de ouro revestidos com membranas extraídas de células tumorais de pulmão conjugadas a um agente anticâncer, beta-Lapachona. O sistema apresentou a seletividade para células tumorais além de serem eficientes na terapia fototérmica em modelos *in vitro* e *in vivo* (Souza, J. P. et al., 2021). Em 2020, Sun et al. revestiram também os nanobastões de ouro com membranas extraídas de células tumorais orais de KB. Além de mostrarem a alta seletividade para célula origem, a combinação da terapia fototérmica e radioterapia mostrou a alta aplicabilidade do sistema para o tratamento de câncer.

[012] Kauscher, U. et al. (2020) desenvolveram supra-partículas baseadas no self-assembly de vesículas extracelulares e nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) de menos de 3 nm de tamanho. As AuNPs hidrofóbicas se localizam na bicamada das vesículas extracelulares. Nesse sistema, as nanopartículas têm a única função de facilitar a identificação do local de internalização das vesículas extracelulares. Lara, P. et al. (2020) também mostraram EVs com AuNPs em seu espaço interno e não na bicamada, para uma melhor marcação das EVs em eventos de metástase.

[013] O artigo de revisão "*Synthesis of gold nanorods and their performance in the field of cancer cell imaging and photothermal therapy*", publicado em 2021, trata sobre o desenvolvimento de métodos de preparação de nanobastões de ouro e a aplicação dos referidos nanobastões no diagnóstico por imagem e terapia fototérmica para tratamento de câncer. Embora funcionalizações de nanobastões de ouro sejam citadas, nenhuma dessas funcionalizações utiliza membrana celular ou vesículas extracelulares, apenas anticorpos e polímeros já conhecidos na literatura e patenteados para o direcionamento ativo ou evasão dos macrófagos, como transferrina e polietileno glicol. Além disso, nesse artigo de revisão não é citada nenhuma metodologia de funcionalização de nanobastões com membranas pelo método de sonicação e extrusão e tampouco a modificação por vesículas extracelulares. O revestimento por vesículas extracelulares adiciona uma complexidade de direcionamento ativo associada ao conjunto de lipídios e proteínas únicos na superfície dos nanobastões.

[014] O artigo "*Pursuing specific chemotherapy of*

orthotopic breast cancer with lung metastasis from docking nanoparticles driven by bioinspired exosomes", publicado em 2019, revela o revestimento de nanopartículas que contém Pt(IV) com exossomos de células RAW 264.7. No entanto, a plataforma final se refere à entrega de pro fármaco Pt(IV) utilizando nanopartículas de albumina humana. Na plataforma da presente invenção, o uso dos nanobastões permite o tratamento via terapia fototérmica, o que até então não foi reportado na literatura com o revestimento de vesículas extracelulares.

[015] O artigo "*Macrophage-cancer hybrid membrane-coated nanoparticles for targeting lung metastasis in breast cancer therapy",* publicado em 2020, revela nanoplatformas carregadas com Dox-PLGA com revestimento biomimético híbrido (RAW-4T1) de membranas de RAW264.7 e membranas de células de câncer de mama 4T1. O objetivo desse artigo é melhorar a entrega de um quimioterápico, focado apenas na terapia utilizando nanopartículas poliméricas. Além do foco da presente invenção ser o tratamento com os nanobastões, o revestimento usado das vesículas extracelulares possui uma identidade proteica e lipídica diferente do revestimento utilizado no referido artigo, uma vez que no artigo trabalham com a membrana das células RAW264.7 e 4T1.

[016] O documento patentário EP 3 583 955 revela um compósito de nanopartículas de núcleo/casca (*core/shell*), incluindo núcleos de exossomos derivados de linhagem celular carregados com fármaco, por exemplo, doxorrubicina, e invólucros de copolímero PEO-PPO-PEO associados na superfície dos núcleos de exossomos derivados de linhagem

celular. A modificação de superfície com polímeros sintéticos pode aumentar a estabilidade das vesículas extracelulares, no entanto, polímeros como o utilizado podem blindar interações nas células. Na presente invenção as vesículas isoladas não são alteradas na sua superfície externa.

[017] O documento WO 2017/173034 revela o uso de exossomos derivados de RAW264.7 em diversas aplicações. Os exossomos foram carregados com catalase, paclitaxel e doxorrubicina e foram utilizados também no revestimento de nanopartículas de ouro. O documento WO 2017/173034 descreve o encapsulamento de nanopartículas pequenas (<5 nm) nas vesículas extracelulares (Figura 11) por diversos métodos, e a eficiência de encapsulamento máxima que foi atingida é de 29%. A primeira diferença desse documento é o uso de nanopartículas esféricas que não possuem as mesmas propriedades que os nanobastões utilizados na presente invenção que apresentam, por exemplo, ótima conversão fototérmica e hipertermia. Os tecidos biológicos têm uma menor autofluorescência próximo ao infravermelho, que é possível alcançar na síntese dos nanobastões e não nas nanopartículas esféricas. Além disso, no método de encapsulamento das nanopartículas esféricas não foi avaliada a eficiência de encapsulamento via extrusão que é o processo realizado para a produção da plataforma nanoestruturada da presente invenção.

[018] O documento WO 2020/078520 refere-se a nanopartículas revestidas com lipídios e seu uso na terapia fototérmica plasmônica no tratamento de câncer. As nanopartículas consistem preferencialmente em metais de

transição ou o óxido de metal de transição. Além disso, são citados nanobastões de ouro e nanopartículas esféricas de ouro. O documento descreve, ainda, que as membranas lipídicas utilizadas podem ser selecionadas, *inter alia*, de exossomos.

[019] Os nanobastões são citados no documento WO 2020/078520, no entanto são usados como um contra-argumento de que após a sua produção pelo método de semente temos a presença de CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) que é comprovadamente tóxico. Na Plataforma da presente invenção tem-se a etapa de depleção do CTAB e a funcionalização com citrato de sódio que torna os nanobastões não tóxicos.

[020] O sistema descrito na presente invenção se difere de outros nanomateriais plasmônicos recobertos com componentes celulares, principalmente pelo uso de nanobastões de ouro de diâmetro menor que 5 nm, além do uso das vesículas extracelulares ou membranas celulares como recobrimento, produzindo a plataforma nanoestruturada.

[021] Além disso, o recobrimento com as vesículas extracelulares ou com membranas celulares de macrófagos mimetiza as nanopartículas, evitando sua eliminação rápida pelo sistema imune. Este novo sistema representa um avanço significativo para o desenvolvimento de métodos seguros para o diagnóstico e tratamento de câncer, sendo um candidato promissor para aplicações em medicina personalizada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção se refere a uma plataforma nanoestruturada com potencial para aplicação no tratamento de câncer. Esta nova plataforma é constituída por nanobastões de ouro recobertos com vesículas extracelulares e/ou membranas celulares de macrófago. Para o

desenvolvimento da plataforma, nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por nucleação na presença do tensoativo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e, então, funcionalizados com citrato de sódio. As vesículas extracelulares e membranas celulares foram isoladas e purificadas por ultracentrifugação. Os nanobastões foram então recobertos com as vesículas e com as membranas por extrusão mecânica através de membrana de 200 nm.

[023] A caracterização do sistema demonstrou que a irradiação com laser na região do infravermelho próximo (808 nm) para o material desenvolvido mostrando sua aplicabilidade em terapia fototérmica. Além disso, estudos *in vitro* revelaram que essa plataforma foi capaz de internalizar em células chave do microambiente tumoral, resultando em uma seletividade alta para o tratamento de câncer.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[024] Figura 1. Caracterização de sementes de síntese de tamanho regular. A) Espectro de extinção das sementes e sua cor. B) Distribuição de tamanho por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) ($n=1$, $PdI=0,195$).

[025] Figura 2. Caracterização do crescimento anisotrópico de nanobastões de ouro de tamanho regular. A) Espectros de extinção de nanobastões sintetizados adicionando quantidades crescentes de nitrato de prata (600, 800 e 900 μ L), utilizando um volume fixo de sementes em 100 μ L. B) Espectro de extinção de nanobastões sintetizados adicionando quantidades crescentes de sementes (50, 70, 100 e 170 μ L), utilizando-se um volume fixo de nitrato de prata em 600 μ L.

[026] Figura 3. Caracterização do crescimento anisotrópico de nanobastões de ouro com adição de ácido sulfúrico. A) Espectro de extinção de nanobastões sintetizados adicionando 1mL de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ com 600 μ L de nitrato de prata e 200 μ L de sementes. B) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) da síntese. C) Histograma da largura. D) Histograma do comprimento avaliando 100 partículas de imagens de SEM.

[027] Figura 4. Luminescência de dois fôtons de nanobastões de ouro (AuNRs). A) espectros de fotoluminescência de AuNRs em diferentes potências de laser Ti:safira a 800 nm de excitação. B) Dependência da intensidade de luminescência em função da potência de excitação em 522 nm.

[028] Figura 5. Caracterização da reprodutibilidade dos nanobastões. O espectro de extinção de AuNRs mostra que as bandas plasmônicas transversais e longitudinais estão com intensidades próximas, o que resulta na alta presença de partículas esféricas. Além disso, a banda longitudinal mostra assimetria.

[029] Figura 6. Caracterização da síntese de mini AuNRs. Espectros de extinção de mini AuNRs variando nitrato de prata em A) 120 μ L e B) 200 μ L e C) diminuindo o volume de sementes pela metade.

[030] Figura 7. Imagens de síntese de mini AuNRs. A) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de mini AuNR com banda longitudinal próxima a 750 nm, utilizando nitrato de prata 200 μ L como na Figura 6B. B) Imagens de MET de mini AuNRs com pico longitudinal próximo a 810 nm, diminuindo a concentração de sementes pela metade em relação

à Figura 6C.

[031] Figura 8. Estudo de conversão fototérmica de mini AuNRs com banda longitudinal de 750 nm. Gráfico de temperatura vs. tempo ao irradiar mini AuNRs (densidade óptica a 750 nm de 0,4, diluído 1:10 em PBS) usando comprimento de onda contínuo irradiado em 808 nm, com potência de 1,5 W cm⁻². Após atingir 90 °C, o laser foi desligado para avaliação do primeiro ciclo fototérmico.

[032] Figura 9. Caracterização de vesículas extracelulares (EVs) e extrato de membrana de macrófagos RAW264.7. A) Esquema da biogênese de EVs e análise de Western blot utilizando anti-CD47, anti-Flotilina 1 (FLOT1) e anti-Anexina 2 (ANXA2). Vesículas extracelulares isoladas de RAW264.7 por etapas de filtração e ultracentrifugação caracterizadas por B) microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM) e C) Análise de Rastreamento de partículas (NTA) e Espalhamento de luz dinâmico (DLS). Extrato de membrana celular de RAW264.7 obtido por lise hipotônica combinada com ruptura mecânica de membrana e ultracentrifugação também foram caracterizados por D) Cryo-TEM, E) Análise de Rastreamento de partículas (NTA) e DLS. Barra de escala: 50 nm.

[033] Figura 10. Caracterização de nanobastões de ouro revestidos com membrana celular (mAuNRs) e vesículas extracelulares (eAuNR) por extrusão com membrana de tamanho de poro de 200 nm. A) Visão esquemática da funcionalização que resultou em diferentes padrões de proteínas e lipídios na superfície das nanopartículas. B) espectros no ultravioleta visível (UV-Vis), C) análise de média Z em ANOVA unidirecional com comparações de Tukey com três sínteses

independentes, D) potencial zeta e E) espectros FTIR de eAuNRs e mAuNRs. Imagens de MET com coloração negativa de F) Citrato de AuNR G) eAuNRs e H) mAuNRs. Barra de escala: 100 nm e 20 nm (As medidas são representadas pela média e as barras de erro representam o erro padrão de três sínteses independentes, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

[034] Figura 11. Estudos de toxicidade das nanopartículas na fonte de linhagens de células saudáveis e câncer metastático. Viabilidade celular de A) RAW 264.7 (verde, n=3), B) 4T1 (azul, n=3) e C) L929 (preto, n=3) de 24 horas por MTT dos nanomateriais funcionalizados com PEG, citrato, EVs e membrana celular na concentração de 1×10^9 partículas mL^{-1} . Ensaio de viabilidade de MTT dos nanomateriais funcionalizados com exossomos e membrana variando as concentrações de 1×10^8 a 5×10^9 partículas mL^{-1} para D) RAW264.7, E) 4T1 e F) L929. Estudos de espécies reativas de oxigênio (ROS) para avaliar, nas duas concentrações mais baixas, o estresse causado pelos bastões em todas as linhagens de células G) fonte, H) câncer e I) saudáveis. (Análise estatística em ANOVA unidirecional com comparações de Tukey, as medições de MTT são representadas por barras de média e barras de erro representam o erro padrão, as medidas de ROS são representadas pela média normalizada com a barra de controle e erro pelo erro padrão, * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

[035] Figura 12. Análise de captação celular dos eAuNRs e mAuNRs. Estudos de endocitose de eAuNR em 1×10^8 partículas mL^{-1} marcadas com DiO após 4 horas de incubação com células A) RAW264.7 (verde, n=3), B) 4T1 (azul, n=3) e C) L929 (preto, n= 3) a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Estudos

de internalização mAuNR em 1×10^8 partículas mL^{-1} também marcados com DiO após 4 horas de incubação com células E) RAW264.7 (verde, n=3), F) 4T1 (azul, n=3) e G) L929 (preto, n= 3) a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . As concentrações utilizadas para amilorida, nistatina, nocodazol, hidroxidinasore e cadaverina foram $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. D) Teor proteico de EVs e extrato de membrana com lisados celulares por *Western Blot* para identificar a presença de CD47 e ALIX. H) Análise de internalização de ICP-MS por teor de ouro em RAW264.7 e 4T1 incubando as nanopartículas em 5×10^8 partículas mL^{-1} por 4 horas (Análise estatística em ANOVA de uma via com comparações de Tukey, as medições são representadas por média e as barras de erro representam o erro padrão, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

[036] Figura 13. Análise da captação celular por microscopia confocal de varredura a laser de RAW264.7 e 4T1 tratados com eAuNR e mAuNR com DiO na mesma intensidade de fluorescência inicial por 4 horas. As imagens foram tiradas com uma lente objetiva de imersão em água de 60x.

[037] Figura 14. Rendimento do isolamento das vesículas extracelulares diminuindo o volume do meio de extração.

[038] Figura 15. Otimização da funcionalização dos nanobastões com citrato de sódio com as vesículas extracelulares. À esquerda, método de sonicação, e à direita, funcionalização após a extrusão.

[039] Figura 16. Nanobastões de ouro funcionalizados com polietilenoglicol não revestidos por vesículas extracelulares.

[040] Figura 17. Internalização preferencial dos nanobastões funcionalizados com vesículas extracelulares nas células tumorais de mama (4T1) e nos macrófagos (RAW264.7).

[041] Figura 18. Caracterização do eAuNR. A) Microscopia eletrônica de transmissão dos nanobastões de ouro funcionalizados com vesículas extracelulares. B) Gráfico representativo da mudança da temperatura vs. tempo em suspensões irradiadas com laser de 808 nm com densidade de potência de 2 W/cm². C) Potencial Zeta das amostras confirmado a mudança de superfícies e D) tamanho próximo à membrana de extrusão do processo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[042] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada que compreende mini nanobastões de ouro revestidos com vesículas extracelulares de macrófagos e/ou com membranas celulares de macrófagos. A referida plataforma possui um potencial de aplicação no tratamento de câncer, preferencialmente câncer de mama.

[043] A plataforma nanoestruturada da presente invenção representa um avanço na medicina personalizada. Os nanobastões de ouro podem ser úteis no tratamento de câncer quando complexados com fármacos antitumoriais, preferencialmente fármacos antitumoriais hidrofóbicos, tais como curcumina, lapachonas e doxorrubicina, melhorando a entrega (*delivery*) destes fármacos.

[044] Uma modalidade da invenção se baseia em diversas etapas otimizadas durante o processo de produção da plataforma nanoestruturada. Inicialmente, a extração das vesículas extracelulares foi melhorada em torno de 15 vezes

alterando o volume usado para a extração (Figura 14). Em uma condição não otimizada são extraídas 10^9 vesículas por litro. No entanto, para a funcionalização com os nanobastões de ouro são necessárias 10^{14} vesículas por litro. O referido processo foi otimizado aumentando o número de garrafas para a extração e diminuindo o volume do meio de extração.

[045] Além da otimização na concentração das vesículas extracelulares, o método de funcionalização dos nanobastões de ouro com as vesículas extracelulares (eAuNR) também foi aprimorado. A etapa de extrusão é crucial para o recobrimento dos nanobastões com as vesículas extracelulares (Figura 15). Uma vez confirmado o método, foi avaliado se a carga dos nanobastões influenciava na metodologia. Concluiu-se que a funcionalização com polietileno glicol impossibilita a colocalização das vesículas ao redor dos nanobastões (Figura 16).

[046] Em uma modalidade da invenção, as vesículas extracelulares e membranas celulares podem ser isoladas a partir de macrófagos, células tumorais ou células tronco. Em uma modalidade preferida, as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de macrófagos, preferencialmente de células RAW264.7.

[047] Além disso, a plataforma nanoestruturada foi testada para uso por meio de internalização celular e entrega dos nanobastões em células do microambiente tumoral. Assim, para comparação, nanobastões foram revestidos com membrana celular de macrófago (mAuNR) com intuito de avaliar se a entrega é preferencial. Observou-se que há uma entrega preferencial do eAuNR em relação aos mAuNR (Figura 17). Esse resultado é promissor para o tratamento de câncer por meio

de fototerapia, uma vez que o direcionamento ativo dos nanobastões garante que os mesmos atuem apenas nas células tumorais.

[048] Em uma modalidade da invenção, (i) uma plataforma nanoestruturada, e (ii) um fármaco antitumoral hidrofóbico, são empregados na fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer, preferencialmente câncer de mama.

[049] Em uma modalidade da presente invenção, a plataforma nanoestruturada é usada em combinação com um fármaco antitumoral hidrofóbico na fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer. Nessa modalidade, o fármaco antitumoral hidrofóbico, de baixa distribuição quando administrado na forma livre, fica localizado na bicamada das vesículas extracelulares. Assim, as vesículas auxiliariam no aumento do tempo de circulação no corpo desses fármacos quando comparado com os fármacos administrados na forma livre. O fármaco antitumoral hidrofóbico pode ser selecionado a partir de curcumina, lapachonas e doxorrubicina.

[050] Em uma modalidade da presente invenção, as nanopartículas plasmônicas são selecionadas a partir de nanossistemas com capacidade de absorver luz no infravermelho. Em uma modalidade preferida, as nanopartículas plasmônicas são nanobastões de ouro.

[051] Em uma modalidade da presente invenção, os nanobastões de ouro (AuNRs) de tamanho regular são preparados através do método que compreende as etapas explicitadas a seguir. As sementes de ouro foram preparadas da seguinte forma: 250-500 μ L de HAuCl₄ a 0,01 mol L⁻¹ foram adicionados

a 7,5-15 mL de CTAB a 0,1 mol L⁻¹ e misturados sob agitação magnética por um minuto. Em seguida, 600-1200 µL de NaBH₄ 0,01 mol L⁻¹ foram adicionados rapidamente e deixados sob agitação por 10-15 minutos. A solução de NaBH₄ foi preparada antes da redução e sob um banho de gelo. As sementes foram mantidas a 25-30 °C antes do uso por 1h30-2 horas, a fim de liberar os gases produzidos na reação.

[052] A solução de crescimento foi preparada pela adição de 3-9 mL de HAuCl₄ a 0,01 mol L⁻¹ em 47-141 mL de CTAB (0,1 mol L⁻¹). Para avaliar a influência do nitrato de prata na relação de aspecto, quantidades crescentes de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹ foram adicionadas (600, 800 e 900 µL) e 480-1440 µL de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹ foi adicionado à solução sequencialmente. Finalmente, foram adicionados 100-300 µL de sementes de ouro pré-preparadas. Adicionalmente, para analisar a influência das sementes na síntese, a solução de crescimento foi preparada como acima, com a diferença de que o volume de nitrato de prata foi fixado em 600-1800 µL a 0,01 mol L⁻¹. Diferentes concentrações de sementes (50-510µL) foram adicionadas à solução de crescimento. Os sistemas foram mantidos em temperatura ambiente entre 12-24 horas e depois, centrifugados 5x a 1500 g por 5 minutos a 4 °C, para remoção do excesso de CTAB.

[053] Em uma modalidade da presente invenção os nanobastões de ouro de diâmetro abaixo de 5 nm (Mini AuNRs) foram preparados através do método compreendendo as seguintes etapas: utilização de sementes de ouro para o crescimento em presença do tensoativo CTAB33. A solução de crescimento foi preparada pela mistura de 9,75-29,25 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹ a 250-750 µL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹ sob

agitação durante um minuto. Em seguida, 600-1800 μ L de NaBH₄ 0,01 mol L⁻¹ gelado é adicionado continuamente sob agitação durante 10-15 min. Essa suspensão é mantida a 25 °C antes de ser utilizada, por duas horas para a liberação de gases produzidos na redução.

[054] Em seguida, 2-6 mL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹ são misturados com 36-108 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹. Na sequência 120-360 μ L de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹, 800-2400 μ L de HCl 1 mol L⁻¹ e 320-960 μ L de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹ são adicionados à solução sequencialmente. Por fim, são adicionados 2-6 mL de sementes de ouro previamente preparadas. O sistema é mantido à temperatura ambiente durante pelo menos 24 horas e, em seguida, centrifugado a 1500 g durante 2 minutos para remover o excesso de CTAB sólido em solução repetindo 5 vezes esse processo.

[055] Os nanobastões resultantes foram posteriormente funcionalizados com citrato, devido à citotoxicidade de CTAB para estudos biológicos. Para isso, 10-100 mL de CTAB_AuNRs foram centrifugados três vezes (16000 g, 85 minutos), para remover o excesso de tensoativo.

[056] O sedimento (pellet) de CTAB_AuNRs foi redisperso em 0,15% em peso de Na-PSS (poliestirenossulfonato de sódio) até um volume final de 20-100 mL e deixado em repouso por pelo menos 2 horas antes da próxima etapa. Essa amostra foi centrifugada duas vezes (16000 g, 85 minutos), redispersas em 0,15% em peso de Na-PSS para um volume final de 500 - 1000 μ L. Esta etapa com o PSS garante a remoção eficiente do CTAB. Por fim, a amostra foi centrifugada com os mesmos parâmetros estabelecidos antes de ser redispersa em 500 - 1000 μ L de citrato de sódio

a 5 mmol L⁻¹, mantendo em repouso por pelo menos 12 horas. A dispersão foi submetida a um segundo ciclo de centrifugação, com volume final de 500 - 1000 µL disperso em 5 mmol L⁻¹ de citrato de sódio.

[057] Para os estudos de funcionalização, os NRs foram submetidos a um terceiro ciclo de centrifugação e ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X.

[058] Para estudos de viabilidade, AuNRs_PEG foram produzidos pelo seguinte procedimento: após a remoção do excesso de CTAB, foi adicionado PEG-SH (Sigma Aldrich) à dispersão de nanobastões de ouro em uma concentração final de 200 µmol L⁻¹ e sonicado por 30 minutos. As nanopartículas foram deixadas durante a noite em uma agitação suave em temperatura ambiente e depois centrifugado para remover o excesso de polímero livre.

[059] Linhagens celulares utilizadas: vírus da leucemia murina do macrófago Abelson transformado (RAW264.7, American Type Culture Collection, ATCC), fibroblastos saudáveis (L929, ATCC), hepatoma de rato (HTC, Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ)) e células de fígado de camundongo saudável (FC3H, BCRJ) foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) L-Glutamina a 37 °C em atmosfera umidificada com 5 % CO₂. Células de câncer de mama metastático (4T1, BCRJ) foram cultivadas no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

1) Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

[060] Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), 3 μ L ou 10 μ L das amostras foram depositadas em grades de cobre por 60 segundos e secas com papel filtro. As amostras foram coradas com 3 μ L de acetato de uranila a 2% por 30 segundos e novamente secas com papel de filtro. CryoTEM, amostras de transmissão criogênica foram preparadas depositando 3 μ L da amostra em uma grade de cobre, o excesso foi seco por 3 segundos com papel filtro e a grade mergulhada em etano líquido. O procedimento foi realizado por Vitrobot Mark. As imagens foram obtidas nos microscópios eletrônicos de transmissão JEOL 1400 e JEM-2100.

2) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

[061] As amostras foram preparadas por *drop-casting* de 10 μ L das amostras diluídas em PBS 1x em substratos de silício limpos e secas sob atmosfera reduzida. O espectro foi coletado por meio de um espectrômetro de infravermelho Nicolet 6700/GRAMS Suite, com 128 varreduras por amostra com resolução de 4 cm^{-1} de 4000 a 400 cm^{-1} .

3) Viabilidade celular

[062] A viabilidade celular foi investigada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) após 24 horas de incubação com as amostras. Todas as células foram semeadas a uma densidade de 2×10^3 células por poço em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas. Antes da incubação, o meio foi removido e 100 μ L de nanopartículas em diferentes concentrações (1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 e 5×10^9 partículas mL^{-1}) foram incubadas em DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS foram adicionadas a cada poço. Para 4T1, as nanopartículas foram ressuspensas em RPMI

10% FBS. Após 24 ou 48 horas, as nanopartículas foram removidas, as células foram lavadas com 1X PBS e 100 μ L a 0,5 mg mL⁻¹ brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi incubado durante 3 horas. Além disso, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço e deixados sob agitação orbital durante pelo menos 15 minutos. As medições foram realizadas em 570 e 630 nm usando um leitor de microplacas SpectraMax M3. A viabilidade celular foi calculada em comparação com os controles sem tratamento, conforme descrito na Equação 1.

$$viabilidade\ cellular\ (%) = \frac{(A_{amostra570} - A_{amostra630})}{A_{controle570} - A_{controle630}} \times 100$$

[063] Onde $A_{amostra570}$ é a absorbância em 570 nm e $A_{amostra630}$ em 630 nm de amostras tratadas, enquanto $A_{controle570}$ e $A_{controle630}$ representam a absorbância de amostras ou controles não tratados. A análise dos dados foi realizada usando o Origin 2020.

4) Ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS)

[064] O ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizado usando 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) como uma sonda. Em placas de 96 poços, 2x10³ células por poço foram semeadas durante 24 horas. Em seguida, eAuNRs e mAuNRs foram incubados por 24 horas em duas concentrações (1x10⁸ e 5x10⁸ partículas mL⁻¹). O controle positivo foi H₂O₂ a 100 μ M e incubado 1 hora antes das 24 horas finais. As células foram lavadas com PBS e incubadas com 50 μ M de H₂DCFDA em meio de cultura de células por 1 hora a 37 °C com 5% de CO₂. A fluorescência foi medida em comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão em 530

nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax M3, após lavagem e adição das células com PBS. Os valores de intensidade de fluorescência foram normalizados pelo ROS do controle.

5) Estudos de absorção celular:

[065] Image Xpress: Em placas de 96 poços, 5×10^3 células por poço (RAW264.7, 4T1 e L929) foram semeadas e cultivadas por 24 horas. O meio foi removido, seguido pela incubação de 100 μL por poço de 1×10^8 partículas mL^{-1} eAuNRs ou mAuNRs (contendo DiO como a sonda fluorescente) por 4 horas. Para estudos de inibição, os agentes: amilorida (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), nistatina (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), nocodazol (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), hidroxi-dinasore (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e dansil-cadaverina (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram incubados por 30 minutos antes da incubação das nanopartículas e não removidos durante a incubação das nanopartículas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS duas vezes, fixadas com paraformaldeído 3,7% (PFA) por 10 minutos e lavadas novamente 3x com PBS. Adicionou-se 2% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) durante 15 minutos. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 100 μL a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 10 minutos. As amostras foram lavadas com PBS seguido de uma lavagem com água destilada. Para as medições, as células foram imersas em 100 μL de PBS.

6) Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

[066] A internalização de RAW264.7 e 4T1 d eAuNRs e mAuNRs foi observada usando um microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). As células foram incubadas em lâminas de vidro, usando placa de 24 poços como suporte, na semeadura inicial de 5×10^4 células por poço e cultivado por

24 horas. As células foram incubadas com 50 μ L de nanopartículas da solução estoque em 500 μ L por 4 horas. Lysotracker™ Deep Red foi incubado a 75 nmol L^{-1} por uma hora antes do final da incubação das nanopartículas. As células foram lavadas duas vezes com 1X PBS e fixadas com 3,7% de PFA por 10 minutos. Antes da incubação com 2% (p/v) de BSA, as células foram lavadas duas vezes com PBS e depois incubadas durante 15 minutos. O DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) foi incubado a 2 μ g mL^{-1} por 10 minutos e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS seguido de água destilada.

[067] As lâminas foram montadas com Fluoroshield. A aquisição de imagens foi realizada em microscópio confocal Zeiss LSM780 com imersão em água e analisada usando Image J.

7) Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS):

[068] A internalização de RAW264.7 e 4T1 das nanopartículas também foi avaliada com ICP-MS. Na placa de 12 poços, as células foram semeadas em 1×10^5 células por poço. Após 24 horas, 1 mL de 5×10^8 partículas mL^{-1} em DMEM e RPMI com 10% de FBS e foram incubados por 4 horas. Após a incubação, o meio contendo as partículas foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas ou raspadas. As células foram centrifugadas a 800 g por 5 minutos, ressuspensas em PBS e a concentração celular foi avaliada com teste de exclusão de azul de tripano. As células foram novamente centrifugadas (800 g, 5 min) e cada pellet foi dissolvido com 500 μ L de água régia e posteriormente diluído em 10 mL de água desionizada. Finalmente, as amostras foram analisadas conforme recebidas pelo LabExata usando NexIon 2000.

8) *Western Blot:*

[069] As amostras (10 μ L e usando 6×10^8 partículas mL^{-1}) foram misturadas com tampão de amostra Laemmli, fervidas a 100 °C por 5 minutos, diluídas em tampão de amostra, carregadas em géis de acrilamida a 8% e corridas a 100 V por aproximadamente 1,5 horas. Os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45 μ m, Biorad) e bloqueados com 5% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) em solução salina tamponada com Tris com 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBST) por 1-2 horas. Para identificação de proteínas, as membranas foram sondadas com anticorpos primários anti-flotilina 1 (1:1000, BD, 610821), anti-CD47 (1:1000, Thermo Fischer PA5-81591) e anti-anexina 2 (1:1000, Sigma Aldrich QC5535), anti-ALIX (1:1000, Abcam Ab186429) e incubado durante a noite a 4 °C. Além disso, as membranas foram lavadas com TBS-T por quatro vezes (5 minutos cada), e os anticorpos secundários foram adicionados e detectados por quimioluminescência intensificada (ECL, Thermo Scientific, 32106 e 34095). Para o lisado celular, as células foram incubadas 2×10^6 células por poço. Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com 1X PBS. O lisado de células foi realizado pela adição de 15 μ L de tampão de lise por 10^6 células em gelo e deixou repousar por 2 horas. Finalmente, o lisado foi centrifugado (10.000 g, 4 °C) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Imagens de membranas foram adquiridas utilizando o ChemidocTM XRS.

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO

1) Método de preparação de nanobastões de ouro

[070] Para os AuNRs de tamanho regular, as sementes foram preparadas da seguinte forma: 250 μ L de HAuCl₄ a 0,01

mol L⁻¹ foram adicionados a 7,5 mL de CTAB a 0,1 mol L⁻¹ e misturados sob agitação magnética por um minuto. Em seguida, 600 µL de NaBH₄ 0,01 mol L⁻¹ foram adicionados rapidamente e deixados sob agitação por 10 minutos. A solução de NaBH₄ foi preparada antes da redução e sob um banho de gelo. As sementes foram mantidas a 25 °C antes do uso por 1h30, a fim de liberar os gases produzidos na reação.

[071] A solução de crescimento foi preparada pela adição de 3 mL de HAuCl₄ a 0,01 mol L⁻¹ em 47 mL de CTAB (0,1 mol L⁻¹). Para avaliar a influência do nitrato de prata na relação de aspecto, quantidades crescentes de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹ foram adicionadas (600, 800 e 900 µL) e 480 µL de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹ foi adicionado à solução sequencialmente. Finalmente, foram adicionados 100 µL de sementes de ouro pré-preparadas. Adicionalmente, para analisar a influência das sementes na síntese, a solução de crescimento foi preparada como mencionado acima, com a diferença de que o volume de nitrato de prata foi fixado em 600 µL a 0,01 mol L⁻¹. Diferentes concentrações de sementes (50, 70, 100 e 170 µL) foram adicionadas à solução de crescimento. Os sistemas foram mantidos em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas e depois centrifugados 5x a 1500 g por 5 minutos a 4 °C para remoção do excesso de CTAB.

2) Método de preparação de nanobastões de ouro de diâmetro abaixo de 5 nm (Mini AuNRs)

[072] A síntese dos nanobastões ouro se baseia no método de sementes para o crescimento em presença do tensoativo CTAB33. A solução de crescimento foi preparada pela mistura de 9,75 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹ a 250 µL de HAuCl₄

0,01 mol L⁻¹ sob agitação durante um minuto. Em seguida, 600 µL de NaBH₄ 0,01 mol L⁻¹ gelado é adicionado continuamente sob agitação durante 10 min. Essa suspensão é mantida a 25 °C antes de ser utilizada, por duas horas para a liberação de gases produzidos na redução.

[073] Em seguida, 2 mL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹ são misturados com 36 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹. Na sequência 120 µL de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹, 800 µL de HCl 1 mol L⁻¹ e 320 µL de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹ são adicionados à solução sequencialmente. Por fim, são adicionados 2 mL de sementes de ouro previamente preparadas. O sistema é mantido à temperatura ambiente durante pelo menos 24 horas e, em seguida, centrifugado a 1500 g durante 2 minutos para remover o excesso de CTAB sólido em solução repetindo 5 vezes esse processo.

[074] Os nanobastões resultantes foram posteriormente funcionalizados com citrato, devido à citotoxicidade de CTAB para estudos biológicos. Para isso, 20 mL de CTAB_AuNRs foram centrifugados três vezes (16000 g, 85 minutos), para remover o excesso de tensoativo.

[075] O sedimento (pellet) de CTAB_AuNRs foi redisperso em 0,15% em peso de Na-PSS até um volume final de 20 mL e deixado em repouso por pelo menos 2 horas antes da próxima etapa. Essa amostra foi centrifugada duas vezes (16000 g, 85 minutos) redispersas em 0,15% em peso de Na-PSS para um volume final de 20 mL. Esta etapa com o PSS garante a remoção eficiente do CTAB. Por fim, a amostra foi centrifugada com os mesmos parâmetros estabelecidos antes de ser redispersa em 1000 µL de citrato de sódio a 5 mmol L⁻¹, mantendo em repouso por pelo menos 12 horas. A dispersão foi

submetida a um segundo ciclo de centrifugação, com volume final de 1000 μL disperso em 5 mmol L^{-1} de citrato de sódio.

3) Caracterização das sementes

[076] A síntese das sementes reside na rápida redução de Au^3+ para Au^0 por NaBH_4 . Assim, o reagente NaBH_4 é uma etapa importante para produzir sementes passíveis de serem adicionadas posteriormente à solução de crescimento. A mudança da solução amarela para a cor marrom (inserção na Figura 1A) mostra a redução efetiva das nanosementes, resultando em uma banda de plasmon de baixa intensidade próxima a 500 nm, característica de nanopartículas com tamanhos abaixo de 10 nm (Figura 1A). Esta banda de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) característica está relacionada ao amortecimento da alta taxa de colisões de elétrons quando em oscilação coletiva, devido ao pequeno tamanho das nanopartículas. A banda LSPR relacionada a tamanhos pequenos é confirmada pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS) na Figura 1B, com uma distribuição de tamanho em torno de 1 nm e índice de polidispersidade (PdI) de 0,195. Medidas DLS sem distorção de tamanho só foram possíveis devido ao baixo índice PdI.

4) Caracterização dos parâmetros de crescimento de AuNRs

[077] Para melhor compreender os efeitos do reagente na síntese, a concentração de nitrato de prata e as sementes foram variadas na solução de crescimento e os resultados são mostrados na Figura 2.

[078] A Figura 1A mostra os espectros de UV-Vis dos nanobastões usando quantidades crescentes de nitrato de prata em uma concentração fixa de sementes de 100 μL .

Concentrações mais altas de nitrato de prata mudaram a banda longitudinal do plasmon para perto do infravermelho, produzindo nanobastões com razões de aspecto mais altas. O AgNO₃ desempenha um papel fundamental no crescimento anisotrópico e, quando não utilizado na síntese, a suspensão final apresenta uma grande população de nanopartículas de formato esférico. Existem diversos mecanismos propostos sobre os efeitos dos íons Ag⁺ na síntese de AuNRs. A principal consideração ao uso de íons Ag⁺ é que, no pH de síntese, os íons não são reduzidos na presença de ácido ascórbico.

[079] Sementes preparadas na presença de CTAB mostram uma morfologia cuboctaédrica e, quando adicionadas à solução de crescimento, cresceram até 4-6 nm isotropicamente. Na presença de nitrato de prata, há a formação de superfícies truncadas nas facetas de interseção {111}, que são locais preferidos para a deposição de íons de prata, resultando em crescimento orientado.

[080] A proporção de aspecto também pode ser controlada alterando a concentração de sementes na dispersão de crescimento. Ao fixar a concentração de nitrato em 600 µL, diferentes quantidades de sementes foram adicionadas, e o espectro UV-Vis é mostrado na Figura 2B. Conforme o número de sementes aumenta, há um deslocamento não linear para vermelho da banda longitudinal, de acordo com dados da literatura. A Figura 2 mostra que ao alterar a concentração de sementes e nitrato de prata ocorre um deslocamento de a banda longitudinal em direção ao infravermelho próximo, entretanto, ainda não é suficiente para aplicações biomédicas. Portanto, a mudança de pH foi avaliada na síntese

de nanobastões. Quando a solução de crescimento foi acidificada com ácido sulfúrico, ocorreu um crescimento lento e aumento da proporção de aspecto, conforme mostrado na Figura 3A. A análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM) (Figura 3B) mostra uma população homogênea de bastões. As avaliações do histograma mostraram uma largura de 14 nm e um comprimento de 42 nm, resultando em uma razão de aspecto de 3 (Figuras 3C e 3D).

5) Análises de fluorescência de dois fótons

[081] A luminescência de dois fótons ou multifótons são ferramentas promissoras para o diagnóstico, pois proporcionam maior penetração nos tecidos quando comparadas à fluorescência de fóton único. A luminescência não linear é baseada na colocalização de dois ou múltiplos fótons de baixa energia (geralmente próximo ao infravermelho) em uma molécula. Esta fluorescência é semelhante à luminescência de fóton único, porém, com um sinal mais fraco. Nanopartículas metálicas podem ser usadas como agentes para amplificar esse sinal por acoplamento ressonante com plasmons de superfície localizados. Os bastões de ouro são atraentes como agentes, uma vez que sua banda de plasmon longitudinal é ressonante no infravermelho próximo, explorando a janela biológica. Além disso, sua anisotropia mantém o plasmon de superfície localizado (LSPR) sem fenômeno de amortecimento. Sabe-se que a anisotropia dos sistemas AuNRs favorece a excitação por dois fótons, quanto maior a razão de aspecto, maior a fluorescência intensidade.

[082] Assim, a caracterização dos AuNRs por luminescência de dois fótons (TPL) é uma etapa fundamental para aplicações biomédicas. A Figura 4 mostra a

caracterização do TPL dos nanobastões de ouro antes da otimização com ácido sulfúrico.

[083] A intensidade do TPL tem uma dependência quadrática da potência do laser (Figura 4A). Portanto, no gráfico de logaritmo espera-se que apresente uma inclinação próxima a 2. O ajuste linear confirmou a natureza não linear do TPL, uma vez que a inclinação é maior que 1.

6) Desafios de reprodutibilidade na síntese de AuNRs

[084] Alguns aspectos foram avaliados durante a otimização de fabricação de AuNRs. Os nanobastões geraram bandas plasmônicas longitudinais assimétricas (Figura 5), provavelmente como consequência de traços de contaminantes na água ou da mudança no pH. Além disso, o envelhecimento do ácido tetracloroáurico foi o principal desafio enfrentado na síntese. Em uma solução nova, há um alto teor de Cl^- , coordenando os íons de ouro, que não produz nanopartículas no formato de bastão.

7) Caracterização de Mini AuNRs

[085] Mini AuNRs possuem diversas vantagens quando comparados aos AuNRs de tamanho normal. Ao diminuir a largura, há uma minimização do espalhamento e da dominância da seção transversal de absorção, o que aumenta a eficiência de conversão fototérmica. Além disso, mini AuNRs exibem uma taxa de depuração mais rápida e maior captação pelas células. A mudança no protocolo está relacionada à adição de ácido clorídrico na solução de crescimento e à adição de 20 vezes mais sementes do que o protocolo tradicional. A Figura 6 mostra a otimização de mini AuNRs alterando o nitrato de prata e os volumes das sementes.

[086] Ao aumentar a concentração de nitrato de

prata, ocorre um deslocamento do pico longitudinal em direção ao vermelho (Figuras 6A-B). Esses resultados confirmam a importância da prata no crescimento anisotrópico pelos mecanismos anteriormente propostos.

[087] Assim como para os AuNRs de tamanho regular, a proporção de sementes: Au^{3+} tem um efeito importante no tamanho. Ao aumentar essa proporção, ocorre uma diminuição dos íons de ouro por semente disponíveis para o crescimento, afetando a espessura das hastes finais. Menos sementes levam a AuNRs mais espessos. Assim, para produzir a síntese de mini AuNRs há aumento de 10-20 vezes na concentração de sementes quando comparados aos métodos tradicionais. Ao contrário dos AuNRs de tamanho normal, uma diminuição nas sementes: Au^{3+} , ainda com excesso de sementes, a síntese produziu bastões mais alongados (Figura 6C).

[088] As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) são exibidas na Figura 7. Ambas as sínteses apresentaram largura inferior a 10 nm. Mini AuNRs usando 200 μL de AgNO_3 (Figura 7A) mostraram uma largura média de 9 nm e comprimento médio de 34 nm, resultando em uma razão de aspecto de 3,7 (100 partículas foram consideradas). Mantendo a mesma concentração de nitrato de prata e diminuindo a concentração de sementes pela metade, obteve-se mini AuNRs com largura média de 7 nm e comprimento de 28 nm, portanto, a razão de aspecto foi de 4 (Figura 7B, foram consideradas 100 partículas).

[089] Nanobastões de ouro podem ser aplicados como agentes fototérmicos para terapia do câncer, e sabe-se que mini AuNRs apresentam melhor desempenho quando comparados aos AuNRs de tamanho normal. Mini AuNRs com banda próxima a

750 nm foram escolhidos para conversão fototérmica (Figura 8). A temperatura aumentou de 25 para 90 °C, com variação total de 65 °C. A temperatura máxima foi atingida em 11,3 minutos de irradiação. O regime de hipertermia, que requer uma faixa de temperatura de 41-50 °C, foi atingido em 1,8 minutos. Quando o laser é desligado, são necessários aproximadamente 30 minutos para diminuir a temperatura para 33 °C, mostrando sua forte capacidade de absorção.

8) Isolamento de vesículas extracelulares

[090] As células RAW264.7 foram cultivadas em frascos de 175 cm². Após 70% da confluência das células, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 1% (v/v) L-Glutamina e 10% (v/v) FBS depletado de exossomos. O meio de cultura celular foi coletado entre 24 - 48 horas e centrifugado a 800 g por 4 minutos em temperatura ambiente para remover as células destacadas. Para evitar contaminação por vesículas maiores, como corpos apoptóticos, o sobrenadante foi submetido à filtração com membrana com tamanho de poro de 0,22 µm. O sobrenadante filtrado foi ultracentrifugado a 100000 g por 2 horas a 4 °C. O sedimento foi lavado com PBS seguido por uma segunda etapa de ultracentrifugação a 100000 g por 2 horas a 4 °C usando uma ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, rotor TLA 110).

[091] O sedimento foi coletado e ressuspenso em PBS contendo comprimidos de coquetel de inibidor de protease SIGMAFAST™ preparados/diluídos de acordo com as especificações do produto/fabricante. Para armazenamento de longo prazo, os EVs foram armazenados a -80 °C e usados dentro de 1 mês após o isolamento.

9) Extração de membrana celular

[092] Células RAW264.7 em 70% de confluência (frascos de 175 cm²), foram destacadas do frasco usando um raspador de células e subsequentemente centrifugadas a 800 g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sedimento foi centrifugado (800 g, 5 minutos) e lavado pelo menos duas vezes com PBS. Em seguida, o sedimento foi ressuspensos com tampão hipotônico (Trisbase 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 10 mM, pH 6,8) e, após 5 minutos, a sedimentação foi realizada por centrifugação a 800 g, por 5 minutos, a 4 °C. O sedimento foi ressuspensos em tampão de lise (sacarose 0,25 M, HEPES 10 mM, ácido succínico 100 mM, EDTA 1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,4), e a solução final foi homogeneizada 70 vezes (1400 revoluções/minuto) em um homogeneizador de vidro VIRTUS PII. O homogenato foi centrifugado a 10000 g, por 20 minutos, a 4 °C para remoção dos restos celulares. Por fim, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100000 g, por 2 horas, a 4 °C, em ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, rotor TLA 110). O sedimento ultracentrifugado contendo as membranas foi ressuspensos em 1x PBS com coquetel de inibidor de protease (SIGMAFASTTM). Para armazenamento de longo prazo, os extratos de membrana celular foram armazenados a -80 °C e usados dentro de 1 mês após a extração.

10) Caracterização de vesículas extracelulares e membrana celular

[093] O uso de vesículas extracelulares derivadas de macrófagos para recuperar nanopartículas reside na vantagem do biorreconhecimento e do perfil proteico para camuflar, facilitando sua entrega às células cancerosas alvo.

[094] Vesículas extracelulares (EVs) obtidas por filtração e ultracentrifugação diferencial e extrato de membrana celular obtido por ultracentrifugação foram caracterizadas por Western Blot, Cryo-TEM, NTA e DLS (Figura 9). O conteúdo de proteínas das EVs e extrato de membrana foram avaliados por Western Blot para identificar a presença de CD47, flotilina 1 e anexina 2 (Figura 9A). CD47 e a anexina 2 foram detectados apenas nas membranas celulares. Além disso, a flotilina 1 estava presente em ambas as vesículas dos macrófagos.

[095] Comparando os níveis de expressão, destaca-se a presença de CD47 apenas no extrato da membrana celular. A tetraspanina CD47 é um receptor de superfície celular presente na membrana das células tumorais que modula a resposta imune e inibe a fagocitose por células do sistema imune. Sua ausência em EVs está relacionada com sua biogênese endossômica, na qual ocorre uma inversão da bicamada lipídica e alteração das proteínas expressas. A flotilina 1 tem papel crucial na produção de EVs e é amplamente explorada como marcador EV, portanto, temos a expressão nos extratos celulares e no EVs. A anexina 2 apresenta moléculas citoplasmáticas residuais nas vesículas da membrana celular como esperado, devido ao protocolo de isolamento por hipotônico e tampão de lise.

[096] A Figura 9B mostra imagens de Cryo-TEM de EVs isoladas de RAW264.7 em que bicamadas lipídicas claras podem ser observadas dentro de uma faixa de tamanho com média de $145,1 \pm 37,5$ nm, de acordo com as medições NTA e DLS (Figura 9C). Da mesma forma, Figura 9D exibe vesículas de bicamadas obtidas de extratos de membrana de RAW264.7 e sua

distribuição de tamanho com NTA de $233 \pm 16,8$ nm, também semelhante a DLS (Figura 9E). Esses resultados mostraram que a ultracentrifugação (UC) não alterou sua característica vesicular. A concentração de partículas medida em NTA para EVs isoladas e extrato de membrana celular foi $(2,1 \pm 1,2) \times 10^{11}$ e $(1,2 \pm 1,1) \times 10^{11}$ partículas mL^{-1} , respectivamente, o que indica um isolamento de alto rendimento para ambas as vesículas.

11) Funcionalização de nanopartículas com membrana celular e EVs

[097] Após a extração, membranas derivadas de células, EVs isolados e nanobastões de ouro foram sonicados, separadamente, em um banho de ultrassom por 15 minutos a 4°C a 37 Hz com 80% de potência. Em sequência, para funcionalização das nanopartículas, membrana celular ou EVs ($100 \mu\text{l}$, 1×10^{11} partículas mL^{-1}) foram adicionados a $1000 \mu\text{L}$ de citrato-AuNRs (densidade óptica da solução estoque a $700 \text{ nm} = 0,4$) e sonicados com os mesmos parâmetros acima. Posteriormente, as nanopartículas foram extrudadas 15 vezes através de membrana de policarbonato de poro de 200 nm usando a mini-extrusora da Avanti, para garantir a localização dos nanobastões no interior das vesículas.

[098] A fim de identificar as diferenças na funcionalização dos NRs que revestem a captação celular, nanobastões de ouro revestidos por vesículas extracelulares e membranas celulares (eAuNRs e mAuNRs, respectivamente) foram marcados com 3,3-dioctadeciloxacarbocianina perclorato (Dio). As nanopartículas foram incubadas, após extrusão, por 1 hora a 37°C com Dio a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para tingir a bicamada lipídica dos EVs e as membranas celulares que revestem os

AuNRs. As amostras foram dialisadas por no mínimo 12 horas para remover o excesso de sonda fluorescente não ligada. Potencial zeta e medições de distribuição de tamanho (DLS) de todas as nanopartículas foram realizadas usando Zetasizer Nano ZS, Malvern. A concentração das vesículas e das nanopartículas foi avaliada com nanotracking analysis (NTA), Nanosight NS300, Malvern.

12) Caracterização de eAuNRs e mAuNRs

[099] Após a extração das vesículas, os nanobastões de ouro foram funcionalizados por extrusão usando membranas de tamanho de poro de 200 nm como demonstrado na Figura 10A. A fabricação de nanobastões de ouro funcionalizados por extrusão foi bem-sucedida para definir os nanobastões de ouro dentro das vesículas.

[100] Inicialmente, os espectros de UV-Vis (Figura 10B) mostraram que as propriedades dos nanobastões funcionalizados mudaram após sua funcionalização com EVs (eAuNRs) e membranas (mAuNRs). O espectro mostra uma curva de absorbância típica para AuNRs, com uma banda em torno de 520 nm e outra entre a região do vermelho distante e do infravermelho próximo. Para os NRs funcionalizados, houve uma diminuição nos espectros de absorção. Ambos, eAuNRs e mAuNRs apresentaram uma mudança em direção ao comprimento de onda vermelho na presença das vesículas devido a mudanças na natureza dielétrica em torno dos nanobastões.

[101] As medidas DLS e NTA mostraram um aumento no tamanho dos bastões funcionalizados com as vesículas (Figura 10C) e uma diminuição na concentração quando comparada às vesículas isoladas). A Figura 10C mostrou um tamanho de $177,9 \pm 19,3$ nm para eAuNRs e $149,5 \pm 9$ nm para valores de mAuNRs

próximos à membrana de policarbonato usada na extrusão. Os índices de polidispersidade foram de $0,46 \pm 0,14$ para eAuNRs e $0,32 \pm 0,07$ para mAuNRs. A concentração de nanopartículas medida pelo NTA só é possível, devido à relação de aspecto baixa de 3,4 e sua largura abaixo dos limites de detecção do equipamento. A análise de NTA mostrou uma concentração de $1,4 \times 10^{11} \pm 1,6 \times 10^{10}$ e $3,4 \times 10^{11} \pm 5 \times 10^{10}$ partículas mL^{-1} para eAuNRs e mAuNRs, respectivamente.

[102] Os AuNRs revestidos com EVs são principalmente cobertos individualmente e com largura inferior a 5 nm, o que não é detectável pelo equipamento. Para o caso dos mAuNRs essa extração está relacionada à montagem de nanobastões dentro da membrana que se comportam como uma partícula esférica maior. Os NRs exibiram valores de potencial zeta de $-37,5 \pm 3,8$ mV que mudaram para $-16,4 \pm 2,4$ mV para os eAuNRs e -18 ± 1 mV para os mAuNRs, valores próximos aos valores das membranas isoladas ($-27,3 \pm 2$ mV) e EVs ($-20,7 \pm 2$ mV), indicando a funcionalização bem-sucedida (Figura 10D).

[103] A Figura 10E mostra a análise FTIR dos AuNRs associados ao material de partida CTAB (AuNRs_CTAB), citrato (AuNRs_cit), EVs (eAuNRs) e extrato de membrana celular (mAuNRs). A troca de CTAB por citrato de sódio pode ser confirmada pela diminuição das duas bandas intensas em 3000 e 2800 cm^{-1} que correspondem ao alongamento simétrico e assimétrico das cadeias de metileno presentes na estrutura CTAB. Além disso, a presença de duas bandas em torno de 1500 cm^{-1} , correlacionadas ao alongamento dos grupos carboxilatos, confirma a presença de citrato (citrato AuNRs).

[104] Após a extrusão dos AuNRs com EVs e membranas

derivadas de células, os espectros de infravermelho mostraram bandas entre 1500 e 1350 cm⁻¹ que correspondem aos modos de deformação de CH₂ e CH₃ a partir de lipídios. Por volta de 1700-1500 cm⁻¹ observamos picos correspondentes às bandas das amidas I e II. Uma banda em 3400 cm⁻¹ foi encontrada mais proeminente na amostra de mAuNRs, que está relacionada à presença de grupos -OH. Isso pode estar relacionado ao nível de hidratação da membrana, uma vez que as amostras foram preparadas para minimizar a influência do espectro de água livre.

[105] eAuNRs e mAuNRs mostraram diferenças de espectro entre 1500 e 1350 cm⁻¹, 1700-1500 cm⁻¹ e 3400 cm⁻¹ bandas características de lipídios, proteínas e nível de hidratação de lipídios, respectivamente. A última banda é mais intensa no mAuNR, e pode estar relacionada ao nível de hidratação da membrana, para o qual as amostras foram preparadas para minimizar isso.

[106] Para melhor investigar a morfologia e o tamanho, os nanomateriais foram avaliados por MET, utilizando coloração negativa (Figura 10F-H). Conforme mostrado nas imagens MET dos nanobastões funcionalizados (Figura 10G-H), há uma camada visível ao redor das hastes em ambos os sistemas. Imagens de MET de mAuNRs revelam mais AuNRs montados juntos com forma irregular, quando comparadas com as imagens de eAuNRs que mostram um revestimento mais individual. A montagem dos nanobastões de ouro quando funcionalizados com a membrana celular nas imagens MET, confirma os efeitos plasmônicos observados na Figura 10B.

13) Caracterização de eAuNR

[107] Para melhor investigar o revestimento e o

tamanho, os eAuNRs (nanobastões de ouro funcionalizados com vesículas extracelulares) foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando coloração negativa por acetato de uracila (Figura 18A). Observou-se revestimento completo em todos os AuNRs.

[108] Além disso, suspensões de PBS e AuNR foram irradiadas com laser de 808 nm de densidade de potência de 2 W/cm² (Figura 18B), mostrando que o potencial de fototermia dos AuNRs não foram alterados com o revestimento. Nas Figuras 18C e 18D são apresentados o potencial Zeta das amostras confirmando a mudança de superfícies e o tamanho próximo à membrana de extrusão do processo.

14) Estudos de toxicidade de eAuNR e mAuNR

[109] Estudos *in vitro* foram realizados para analisar o efeito de diferentes funcionalizações dos AuNRs na viabilidade celular. A viabilidade celular de três tipos celulares, células semelhantes a macrófagos (RAW 264.7), células de tumor de mama (4T1) e fibroblastos (L929), foi avaliada por ensaio de MTT com incubação de 24 horas (Figura 11). mAuNRs, eAuNR e citrato AuNR mostraram alta toxicidade na célula de origem (Figura 11A). AuNRs_PEG não mostrou redução na viabilidade com base no fato de que o PEG impede a identificação por células do sistema imunológico. A alta toxicidade está relacionada à característica intrínseca dos macrófagos em internalizar mais nanopartículas, que podem ser ajustadas para aplicações biomédicas.

[110] No caso de 4T1, os resultados para incubação de 24 horas mostraram uma diferença estatística entre AuNRs_cit e AuNRs_PEG (Figura 11B), com um aumento na atividade mitocondrial para AuNR de citrato. A viabilidade

celular de células de câncer de mama metastático não reduziu com as plataformas nanoestruturadas derivadas de células e a única diferença foi um aumento na atividade mitocondrial quando incubadas com citrato AuNR, como resultado do citrato ser uma parte central da via bioquímica na produção de energia das células, e altamente usado em células tumorais para crescimento rápido. Todas as formulações não mostraram nenhuma redução estatisticamente significativa na viabilidade de fibroblastos L929, apenas uma tendência de mAuNRs para diminuir visualmente a viabilidade (Figura 11C).

[111] Ensaios dependentes da concentração foram realizados para analisar as diferenças entre os grupos eAuNRs e mAuNRs. Para células RAW264.7, na concentração mais baixa de 1×10^8 partículas mL^{-1} , mAuNR causou uma toxicidade maior quando comparado com eAuNR (Figura 11D), um indicativo de diferentes vias de internalização. As concentrações mais altas de ambos os nanomateriais diminuíram a viabilidade aproximadamente em 50%. A viabilidade de 4T1 e L929 (Figuras 11E e 11F) não foi afetada pelas mudanças de concentração ou funcionalização.

[112] A detecção de ROS intracelular, usando 1×10^8 partículas mL^{-1} e 5×10^8 partículas mL^{-1} de nanopartículas mostrou que não houve estresse oxidativo em todas as células (RAW 264.7, 4T1 e L929) após o tratamento com nanobastões funcionalizados com PEG, citrato, EVs ou membrana celular (Figura 11G-I). Algumas células quando expostas a nanobastões de ouro apenas aumentam a produção de ROS por causa da irradiação e terapia fototérmica.

15) Ensaios de absorção celular

[113] Para elucidar as diferenças de revestimento

(EVs, membranas celulares) que poderiam ser responsáveis por diferentes perfis de toxicidade entre as linhagens celulares, os mecanismos de endocitose foram avaliados por inibidores farmacológicos das principais vias endocíticas das nanopartículas (Figura 12). A captação celular foi investigada usando técnicas de fluorescência, as nanopartículas foram marcadas com DiO, uma sonda fluorescente que se internaliza na bicamada lipídica das vesículas. Como inibidores de captação foram utilizados nistatina, amilorida, hidroxi-dinasore, nocodazol e dansilcadaverina inibe cavéolas, macropinocitose, dinamina, microtúbulos e endocitose dependente de clatrina, respectivamente.

[114] Para eAuNRs (Figuras 12A-C), a internalização foi impulsionada por endocitose dependente de dinamina independentemente do tipo de célula. Essa via endocítica é mediada por vários receptores de superfície celular, por exemplo, heparan sulfato proteglicano e galectina-5.

[115] Para células RAW264.7, ao inibir a endocitose dependente de clatrina (Figura 12A), a captação de eAuNRs aumentou, mostrando uma regulação cruzada entre os mecanismos endocíticos. Além disso, eAuNRs interagiram mais com a fonte em comparação com outras linhagens de células. A Figura 12E mostrou que a endocitose de mAuNR na célula fonte foi impulsionada pelas vias de macropinocitose, dinamina e microtúbulos, relacionadas aos inibidores de amilorida, hidroxi-dinasore e nocodazol, respectivamente. A inibição dependente de clatrina aumentou ligeiramente para esses mAuNRs como um mecanismo de regulação cruzada do macrófago para compensar as deformações na membrana celular.

Em particular para células de câncer de mama metastático (Figura 12B), a macropinocitose também mostrou ser uma via de endocitose importante para eAuNR. Ressalta-se que a internalização desses mAuNRs pelas células 4T1 (Figura 12F) sugeriu outra via endocítica. A linhagem de células saudáveis endocita o eANR e mAuNR via dinamina e dependentes de clatrina, respectivamente (Figura 12C-G).

[116] As diferenças nas vias podem ser explicadas pelas diferenças na expressão de proteínas nas células (Figura 12D). A principal diferença entre as nanopartículas analisadas é a falta de expressão do CD47, a sinalização 'não me coma' nas EVs, o que corrobora para o aumento da captação dos eAuNRs pela célula fonte do macrófago. Outro resultado interessante obtido no *Western Blot* é a alta expressão de CD47 em 4T1, em comparação com as outras linhagens celulares. Este resultado está de acordo com a via dirigida pela tetraspanina para internalizar mAuNRs, como uma adesão celular homotípica, que se mostrou dependente de filamentos de actina. Essa adesão homotípica é um dos mecanismos de desenvolvimento de tumores metastáticos e comumente usada na membrana celular de nanopartículas. A expressão de ALIX em células é conhecida por caracterizar preferencialmente a internalização de moléculas por meio de uma endocitose independente de clatrina. Além disso, esse marcador é usado como caracterização de EVs pequenos porque está relacionado a vias endossomais. Em nossos ensaios de inibição, a endocitose mediada por clatrina é responsável apenas por uma pequena porção da internalização em L929 para mAuNRs, e a expressão de ALIX é semelhante para todos os lisados celulares.

[117] A análise de ICP-MS (Figura 12H) mostrou que a funcionalização de nanobastões de ouro com as vesículas diminuiu a absorção pelos macrófagos na mesma concentração de nanopartículas, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre eAuNRs e mAuNRs. Esses resultados corroboram o ensaio de viabilidade e em concentrações acima de 5×10^8 partículas mL^{-1} a toxicidade é a mesma, uma vez que libera a mesma concentração de ouro.

[118] Os estudos de internalização foram feitos por microscopia confocal de varredura a laser (Figura 13). eAuNRs e mAuNRs foram incubados com células RAW264.7 e 4T1 na mesma intensidade de fluorescência inicial por poço, por 4 horas. As imagens mostram uma absorção preferencial de eAuNRs em vez de mAuNRs na célula de origem, e o oposto ocorre ao comparar as nanopartículas na linhagem de células de câncer de mama. Em 4T1 observou-se um aumento da captação de mAuNRs do que eAuNRs e uma tendência de colocalização com Lysotracker, também mostrada na Figura 13.

[119] Por fim, a plataforma nanoestruturada da presente invenção, cujo recobrimento com as vesículas extracelulares ou com membranas celulares de macrófagos mimetiza as nanopartículas evitando sua eliminação rápida pelo sistema imune, representa um avanço significativo para o desenvolvimento de métodos seguros para o diagnóstico e tratamento de câncer. Além disso, estudos *in vitro* revelaram que essa plataforma possui excelente direcionamento tumoral, sendo um meio ideal para liberação de fármacos hidrofóbicos.

[120] Todas as terminologias e abreviações técnicas ou científicas usadas no presente relatório descriptivo têm os mesmos significados que os normalmente entendidos por um

versado na técnica que pertence ao domínio da invenção, salvo indicação em contrário.

[121] A descrição precedente é fornecida para propósitos ilustrativos somente, não devendo ser entendida como uma limitação do escopo da presente invenção.

REFERÊNCIAS

[122] Hu, M. et al. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J. Mater. Chem.* 18, 1949 (2008).

[123] Durr, N. J. et al. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett.* (2007) doi:10.1021/nl062962v.

[124] Cai, X. et al. In vivo quantitative evaluation of the transport kinetics of gold nanocages in a lymphatic system by noninvasive photoacoustic tomography. *ACS Nano* 5, 9658–9667 (2011).

[125] de Aberasturi, D. J., Serrano-Montes, A. B. & Liz-Marzán, L. M. Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Adv. Opt. Mater.* 3, 602–617 (2015).

[126] Maeda, H., Bharate, G. Y. & Daruwalla, J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* vol. 71 409–419 (2009).

[127] Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M. & Mulvaney, P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. in *Coordination Chemistry Reviews* vol. 249 1870–1901 (2005).

[128] Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. a. Preparation

and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.* 15, 1957–1962 (2003).

[129] Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. a. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Gold Nanorods †. *J. Phys. Chem. A* 107, 3372–3378 (2003).

[130] Huang, B. X., Neretina, S. & El-sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. 19122, 4880–4910 (2009).

[131] Bisso, S. & Leroux, J. C. Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability. *Int. J. Pharm.* (2020) doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119098.

[132] Wilhelm, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* (2016) doi:10.1038/natrevmats.2016.14.

[133] Nel, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557 (2009).

[134] Salvati, A. et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* 8, 137–43 (2013).

[135] Fang, R. H., Kroll, A. V., Gao, W. & Zhang, L. Cell Membrane Coating Nanotechnology. *Adv. Mater.* 30, 1–34 (2018).

[136] Hu, C.-M. J. et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 10980–10985 (2011).

[137] Chen, Z. et al. Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing

photothermal therapy efficacy in tumors. *Biomaterials* 192, 10049-10057 (2019).

[138] Sun, H. et al. Cancer-Cell-Biomimetic Nanoparticles for Targeted Therapy of Homotypic Tumors. *Adv. Mater.* 28, 9581-9588 (2016).

[139] Jin, J. et al. Human Cancer Cell Membrane-Coated Biomimetic Nanoparticles Reduce Fibroblast-Mediated Invasion and Metastasis and Induce T-Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces* vol. 11 7850-7861 (2019).

[140] Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226-1232 (2016).

[141] Kanada, M. et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E1433 LP-E1442 (2015).

[142] Nie, W. et al. Responsive Exosome Nano-bioconjugates for Synergistic Cancer Therapy. *Angew. Chemie Int. Ed.* 59, 2018-2022 (2020).

[143] Lara, P. et al. Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *J. Nanobiotechnology* 18, 1-17 (2020).

[144] Kamerkar, S. et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 546, 498-503 (2017).

[145] Lara, P., Chan, A. B., Cruz, L. J., Quest, A. F. G. & Kogan, M. J. Exploiting the natural properties of extracellular vesicles in targeted delivery towards specific cells and tissues. *Pharmaceutics* 12, 1-25 (2020).

- [146] Yuan, L., Liu, Y., Qu, Y., Liu, L. & Li, H. Exosomes derived from microRNA-148b-3p-overexpressing human umbilical cord mesenchymal stem cells restrain breast cancer progression. *Front. Oncol.* 9, 1-14 (2019).
- [147] Théry, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7, (2018).
- [148] Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Emerging picture of the distinct traits and functions of microvesicles and exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3589-3590 (2015).
- [149] Marangoni, V. S., Cancino Bernardi, J., Reis, I. B., Fávaro, W. J. & Zucolotto, V. Photothermia and Activated Drug Release of Natural Cell Membrane Coated Plasmonic Gold Nanorods and β -Lapachone. *ACS Appl. Bio Mater.* (2019) doi:10.1021/acsabm.8b00603.
- [150] Souza, J. P. et al. Toxicity of gold nanorods on Ceriodaphnia dubia and Danio rerio after sub-lethal exposure and recovery. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2021) doi:10.1007/s11356-021-12423-w.
- [151] Sun, Q. et al. Cancer cell membrane-coated gold nanorods for photothermal therapy and radiotherapy on oral squamous cancer. *J. Mater. Chem. B* 8, 7253-7263 (2020).
- [152] Kauscher, U. et al. Gold Nanocluster Extracellular Vesicle Supraparticles: Self-Assembled Nanostructures for Three-Dimensional Uptake Visualization. *Langmuir* 36, 3912-3923 (2020).
- [153] Nakase, I., Kobayashi, N. B., Takatani-

Nakase, T. & Yoshida, T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci. Rep.* 5, 10300 (2015).

[154] Chang, H. H. & Murphy, C. J. Mini Gold Nanorods with Tunable Plasmonic Peaks beyond 1000 nm. *Chem. Mater.* (2018) doi:10.1021/acs.chemmater.7b05310.

REIVINDICAÇÕES

1. Plataforma nanoestruturada caracterizada por compreender nanopartículas plasmônicas e vesículas extracelulares,

em que as nanopartículas plasmônicas são recobertas com as vesículas extracelulares.

2. Plataforma nanoestruturada caracterizada por compreender nanopartículas plasmônicas e membranas celulares,

em que as nanopartículas plasmônicas são recobertas com as membranas celulares.

3. Plataforma nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de macrófagos, células tumorais ou células tronco.

4. Plataforma nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de macrófagos.

5. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de células RAW264.7.

6. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas são selecionadas a partir de nanossistemas com capacidade de absorver luz no infravermelho.

7. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas são nanobastões de ouro.

8. Plataforma nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que os nanobastões de ouro possuem diâmetro inferior a 5 nm.

9. Plataforma nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas recobertas com vesículas extracelulares apresentam tamanho de $177,9 \pm 19,3$ nm, índice de polidispersidade de $0,46 \pm 0,14$, concentração de partículas de $1,4 \times 10^{11} \pm 1,6 \times 10^{10}$ mL⁻¹ e potencial zeta de $-16,4 \pm 2,4$ mV.

10. Plataforma nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas recobertas com membranas celulares apresentam tamanho de $149,5 \pm 9$ nm, índice de polidispersidade de $0,32 \pm 0,07$, concentração de partículas de $3,4 \times 10^{11} \pm 5 \times 10^{10}$ mL⁻¹ e potencial zeta de -18 ± 1 mV.

11. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** por demonstrar irradiação com laser na região do infravermelho próximo.

12. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizada** por ser utilizada para tratamento de câncer.

13. Plataforma nanoestruturada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** por ser utilizada em combinação com um fármaco antitumoral, preferencialmente um fármaco antitumoral hidrofóbico

selecionado a partir de curcumina, lapachonas e doxorrubicina.

14. Método de preparação da plataforma nanoestruturada, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, o método **caracterizado** por compreender as etapas de:

- (a) sintetizar nanopartículas plasmônicas;
- (b) isolar e purificar vesículas extracelulares e/ou membranas celulares; e
- (c) recobrir as nanopartículas plasmônicas com as referidas vesículas extracelulares e/ou membranas celulares.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a etapa (a) compreende as subetapas de:

- (i) adicionar 9,75-29,25 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹ a 250 a 750 µL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹ sob agitação durante um minuto;
- (ii) adicionar continuamente sob agitação 600 a 1800 µL de NaBH₄ 0,01 mol L⁻¹ gelado durante 10 a 15 min;
- (iii) manter a suspensão a 25 °C por uma hora e meia a duas horas;
- (iv) adicionar 2 a 6 mL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹ a 36 a 108 mL de CTAB 0,1 mol L⁻¹;
- (v) adicionar 120 a 360 µL de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹, 800 a 2400 µL de HCl 1mol L⁻¹ e 320-960 µL de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹ à solução;
- (vi) adicionar 2 a 6 mL de sementes de ouro;
- (vii) manter à temperatura ambiente durante pelo menos 24 horas;
- (viii) centrifugar 5 vezes a 1500 g durante 2 minutos;

(ix) centrifugar três vezes a 16000 g durante 85 min 10 a 100 mL da solução de CTAB_AuNR;

(x) ressuspender o pellet em Na-PSS a 0,15% em peso até um volume final de 10 a 100 mL;

(xi) manter em repouso durante pelo menos 2 horas antes da etapa seguinte;

(xii) centrifugar duas vezes a solução a 16000 g por 85 min redispersas em 0,15% em peso de Na-PSS para um volume final de 500 a 1000 μ L;

(xiii) centrifugar a solução a 16000 g durante 85 min;

(xiv) redispersar a solução em 500 - 1000 μ L de citrato de sódio a 5 mmol L^{-1} ;

(xv) manter em repouso durante pelo menos 12 horas; e

(xvi) centrifugar a dispersão a 16000 g durante 85 min com volume final de 500 - 1000 μ L mL disperso em 5 mmol L^{-1} de citrato de sódio.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que, para o isolamento de vesículas extracelulares, a etapa (b) compreende as subetapas de:

(i) cultivar as células em frascos de 175 cm^2 ;

(ii) após 70% da confluência das células, substituir o meio de cultura por DMEM suplementado com 1% (v/v) L-Glutamina e 10% (v/v) FBS depletado de exossomos;

(iii) coletar o meio de cultura celular entre 24 e 48 horas e centrifugar a 800 g por 4 minutos em temperatura ambiente;

(iv) filtrar o sobrenadante com membrana de 0,22 μ m;

(v) submeter o sobrenadante a ultracentrifugação a 100000 g por 2 horas a 4 °C;

(vi) lavar o pellet com PBS;

(vii) submeter o sobrenadante a uma segunda ultracentrifugação a 100000 g por 2 horas a 4 °C; e

(viii) coletar e ressuspender o sedimento em PBS contendo comprimidos de coquetel de inibidor de protease.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que, para a extração de membranas celulares, a etapa (b) compreende as subetapas de:

(i) cultivar as células em frascos de 175 cm²;

(ii) após 70% da confluência das células, destacar as células do frasco e centrifugá-las a 800 g por 5 minutos em temperatura ambiente;

(iii) centrifugar o sedimento a 800 g por 5 minuto e lavar pelo menos duas vezes com PBS;

(iv) ressuspender o sedimento com tampão hipotônico;

(v) após 5 minutos, submeter o sobrenadante a centrifugação a 800 g por 5 minutos a 4°C;

(vi) ressuspender o sedimento em tampão de lise e homogeneizar 70 vezes (1400 revoluções /min);

(vii) centrifugar o homogenato a 10000 g por 20 minutos a 4 °C;

(viii) submeter o sobrenadante a ultracentrifugação a 100000 g por 2 horas a 4 °C;

(ix) ressuspender o sedimento em PBS contendo coquetel de inibidor de protease.

18. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a etapa (c) compreende as subetapas de:

(i) após a extração, sonicar as vesículas extracelulares, as membranas celulares derivadas de células

e os nanobastões de ouro, separadamente, em um banho de ultrassom por 15 min a 4 °C a 37 Hz com 80% de potência;

(ii) adicionar 100 µL da suspensão a 1000 µL de citrato-AuNRs;

(iii) sonicar a suspensão em um banho de ultrassom por 15 min a 4 °C a 37 Hz com 80% de potência;

(iv) realizar a extrusão da amostra 15 vezes através de membrana de policarbonato de 200 nm.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, **caracterizado** pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de macrófagos, células tumorais ou células tronco.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 19, **caracterizado** pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de macrófagos.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 20, **caracterizado** pelo fato de que as vesículas extracelulares e membranas celulares são isoladas a partir de células RAW264.7.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 21, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas são selecionadas a partir de nanossistemas com capacidade de absorver luz no infravermelho.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 22, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas plasmônicas são nanobastões de ouro.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que os nanobastões de ouro possuem diâmetro inferior a 5 nm.

25. Uso de (i) uma plataforma nanoestruturada, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e (ii) um fármaco antitumoral hidrofóbico, caracterizado por ser na fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer.

26. Uso, de acordo com reivindicação 25, caracterizado por o fármaco antitumoral hidrofóbico ficar localizado na bicamada das vesículas extracelulares.

27. Uso, de acordo com reivindicação 25 ou 26, caracterizado por o fármaco antitumoral hidrofóbico ser selecionado a partir de curcumina, lapachonas e doxorrubicina.

28. Uso, de acordo com reivindicação 25, caracterizado pelo fato de o câncer ser câncer de mama.

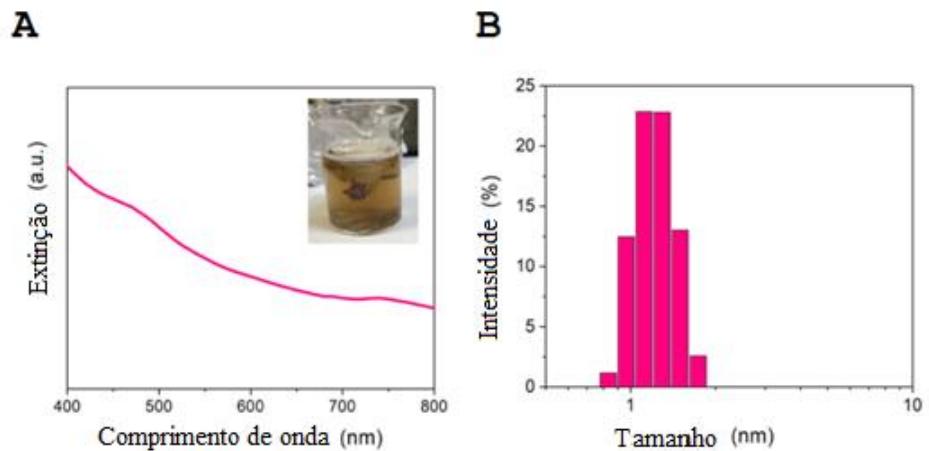


Figura 1

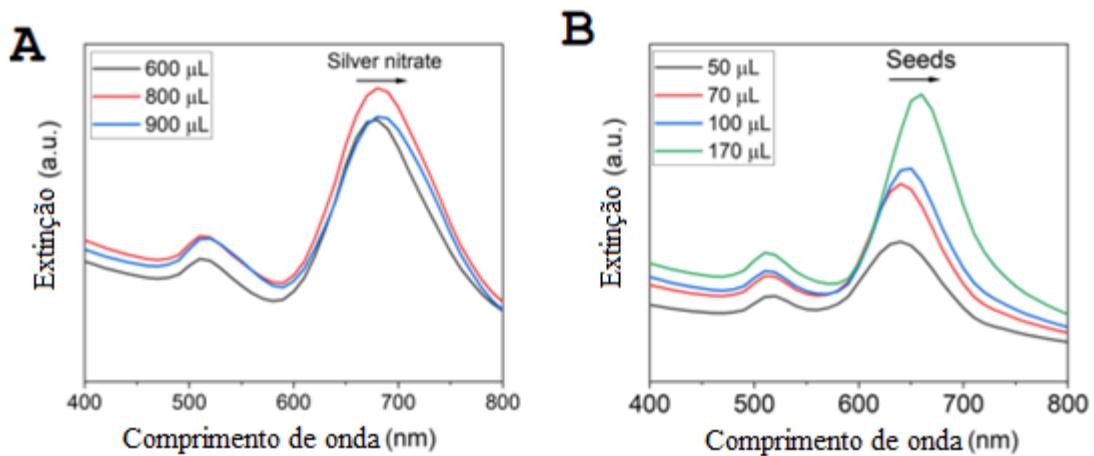


Figura 2

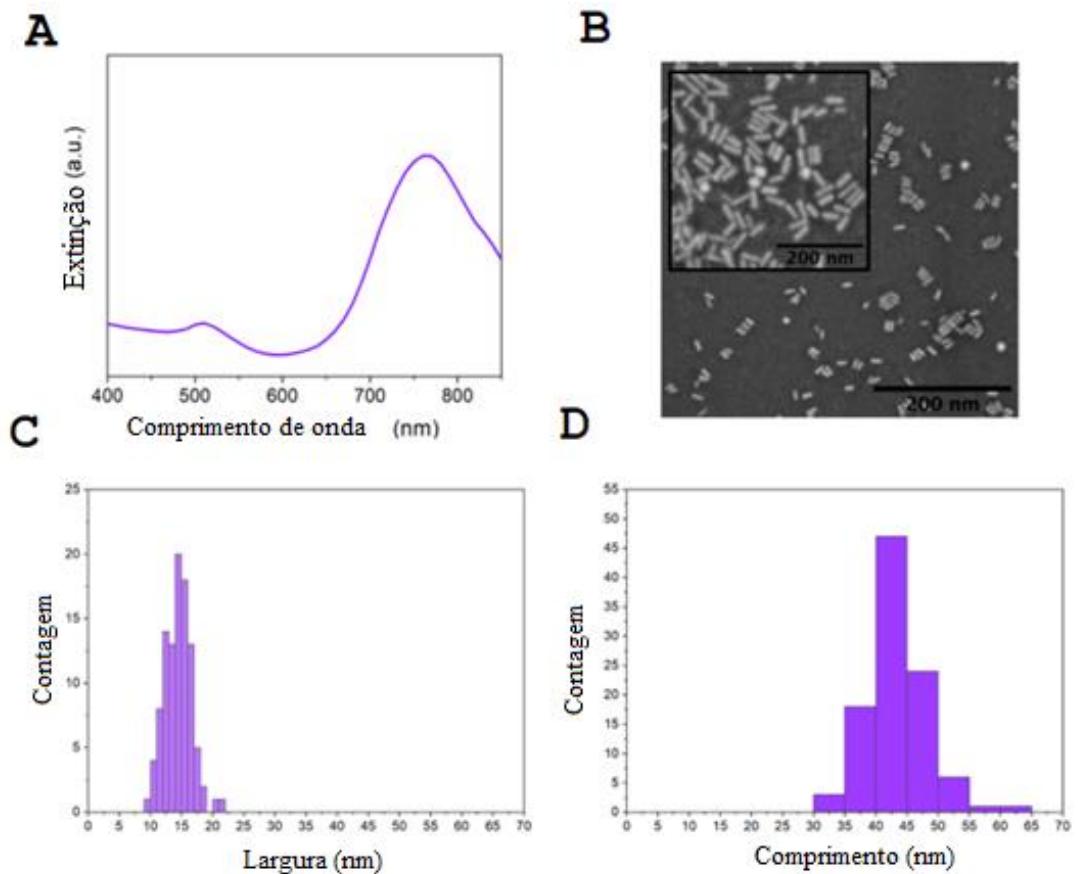


Figura 3

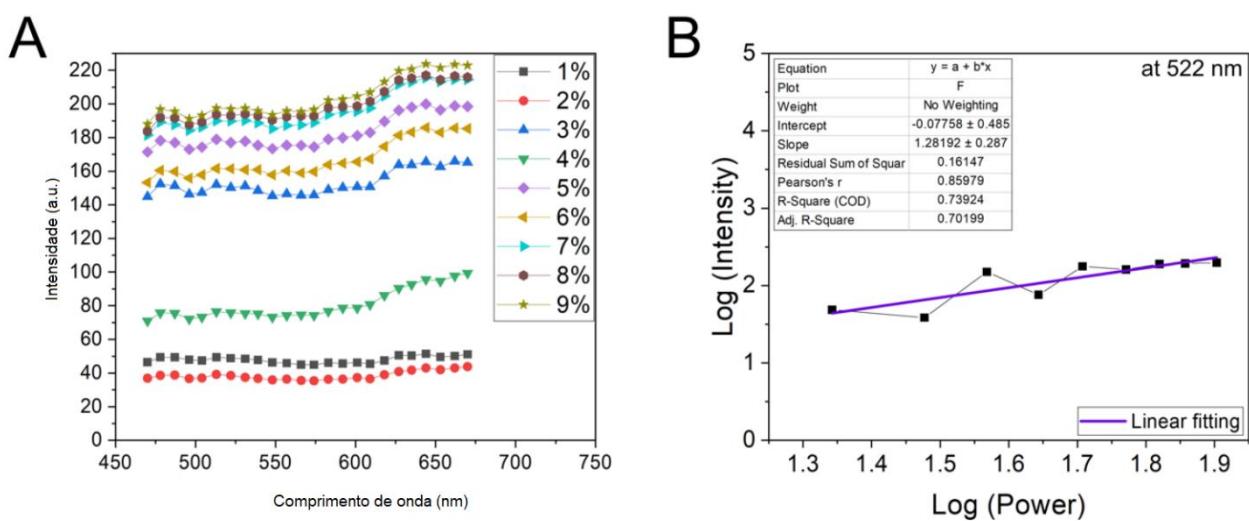


Figura 4

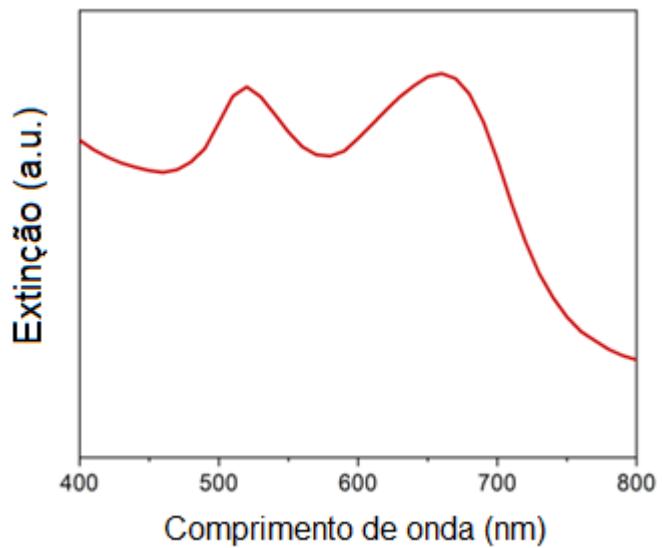


Figura 5

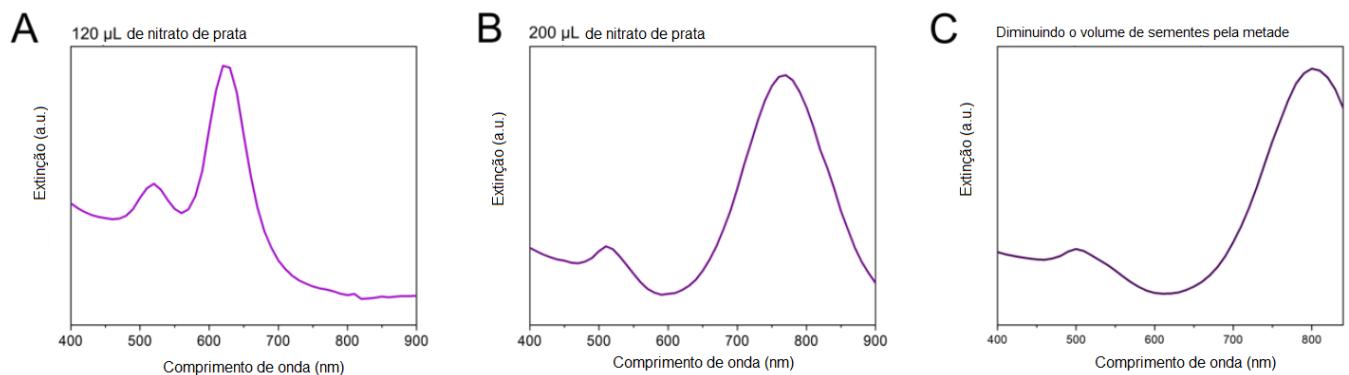


Figura 6

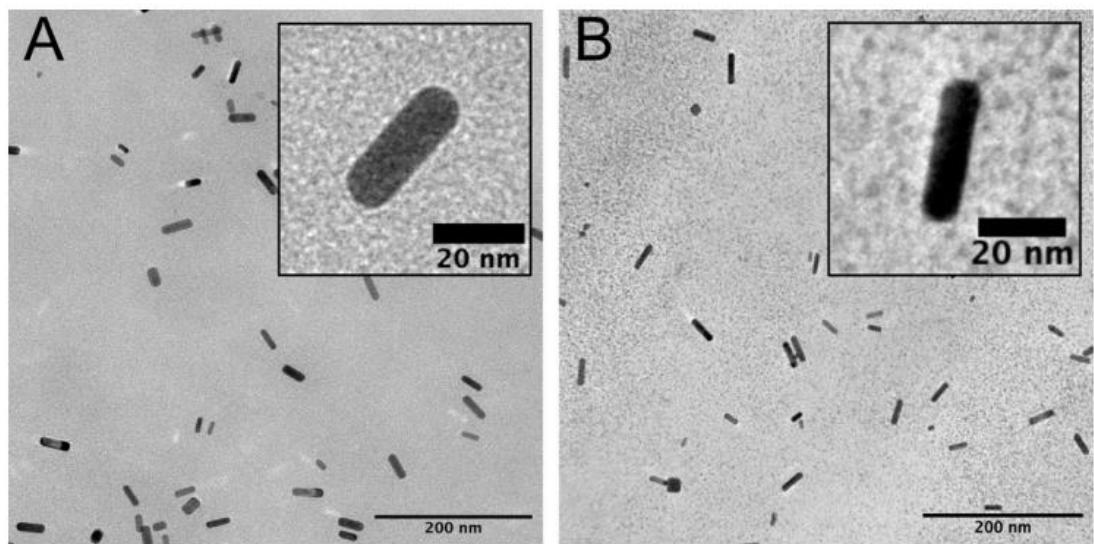


Figura 7

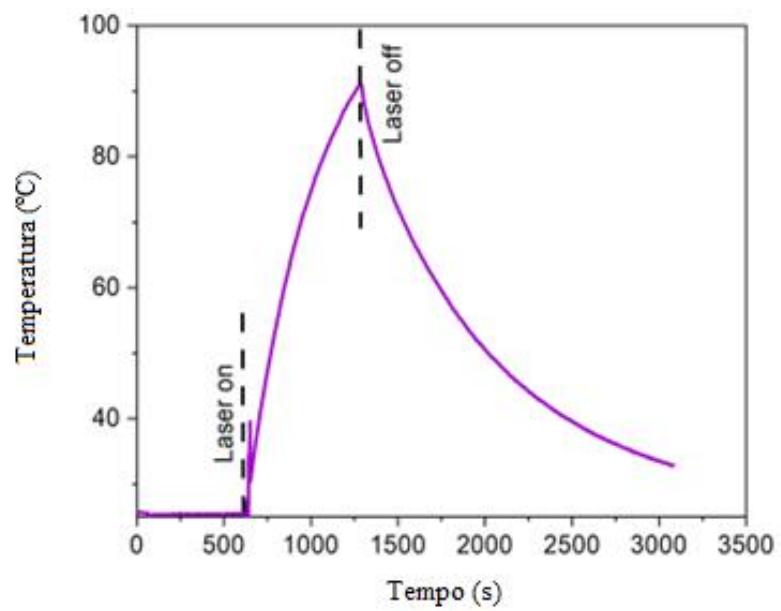


Figura 8

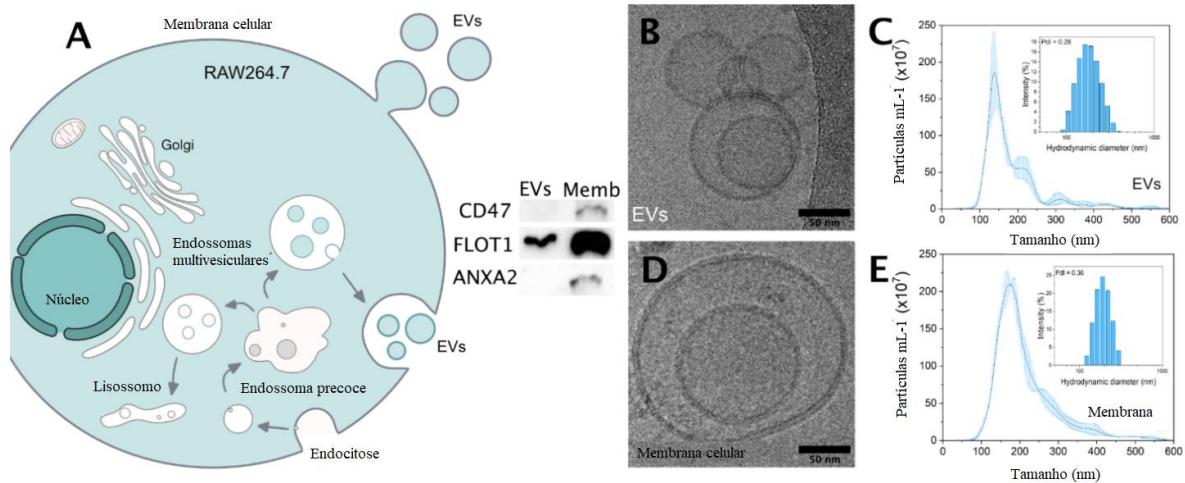


Figura 9

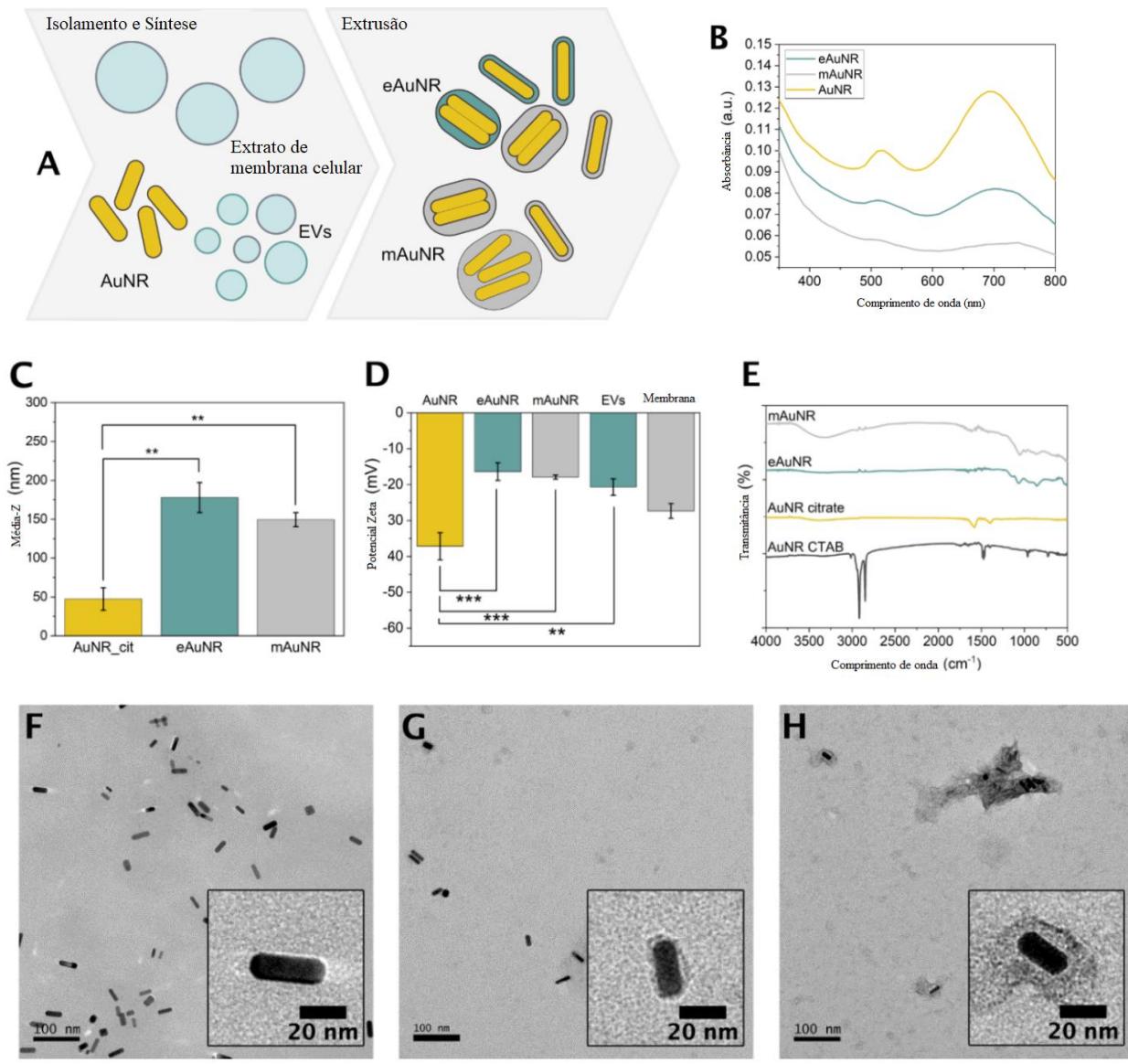


Figura 10

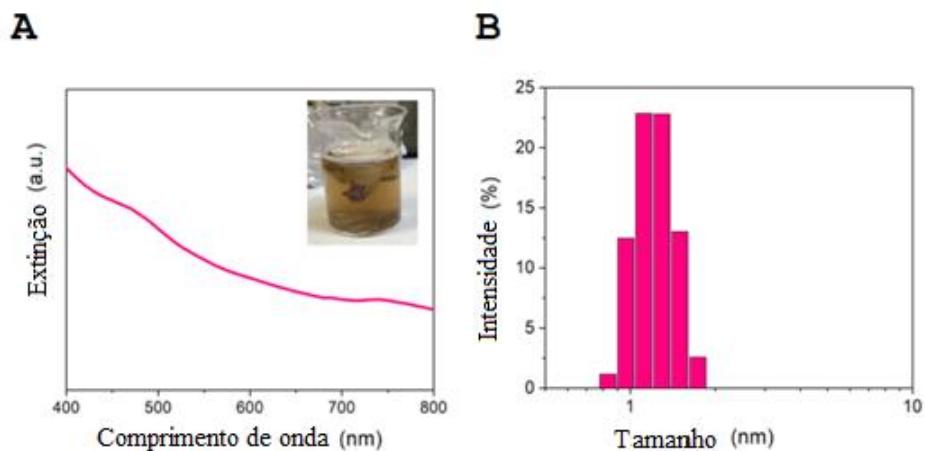


Figura 1

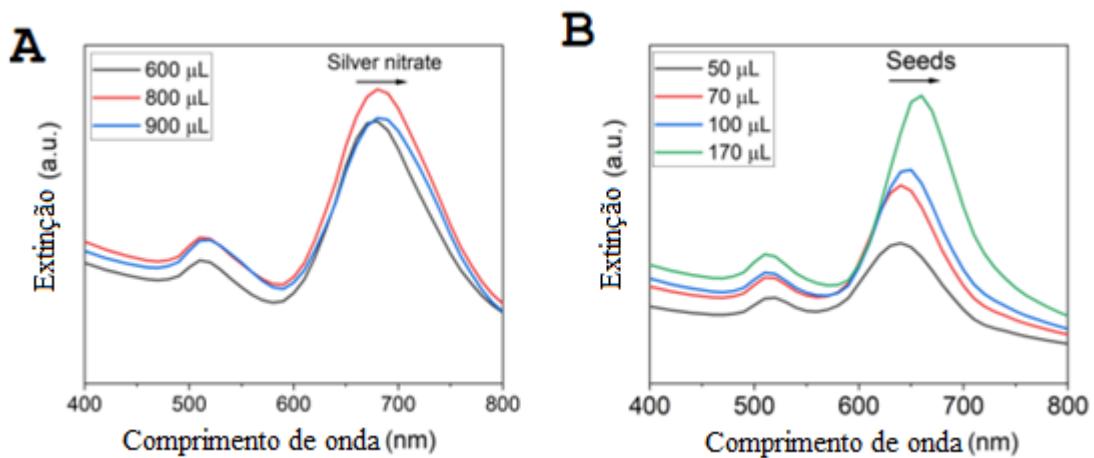


Figura 2

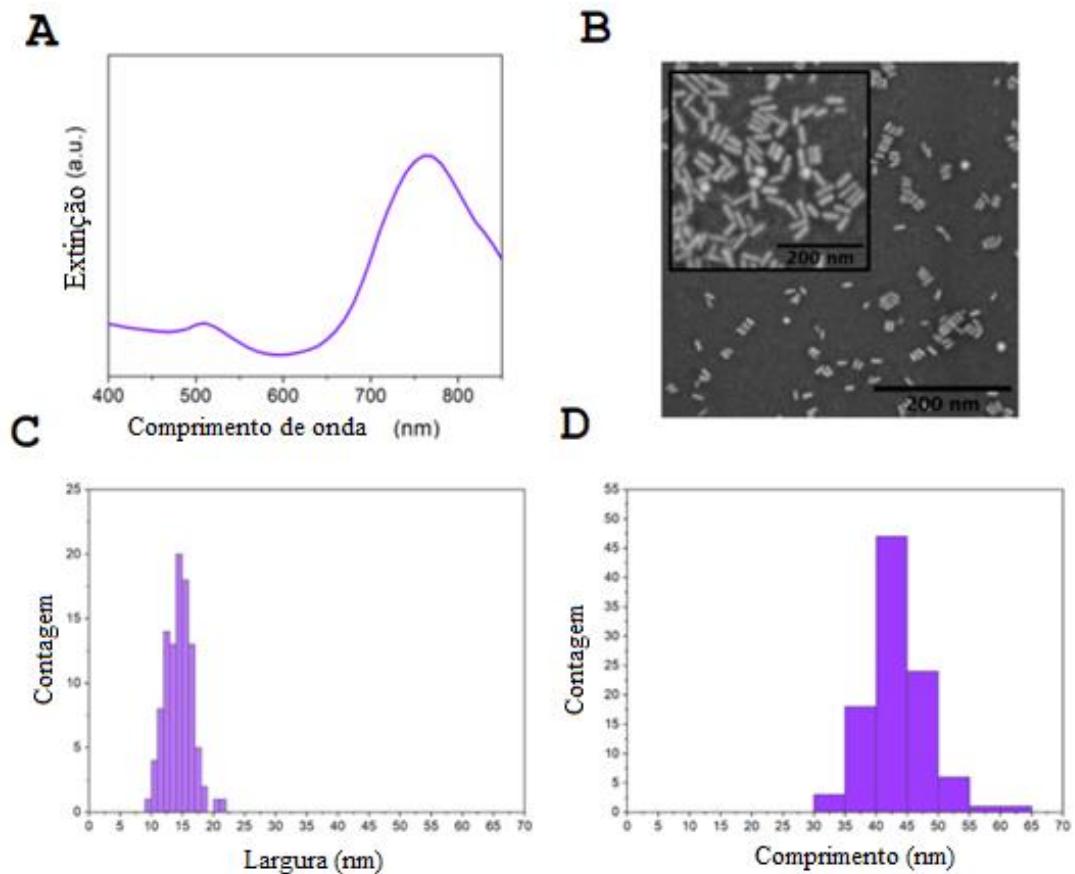


Figura 3

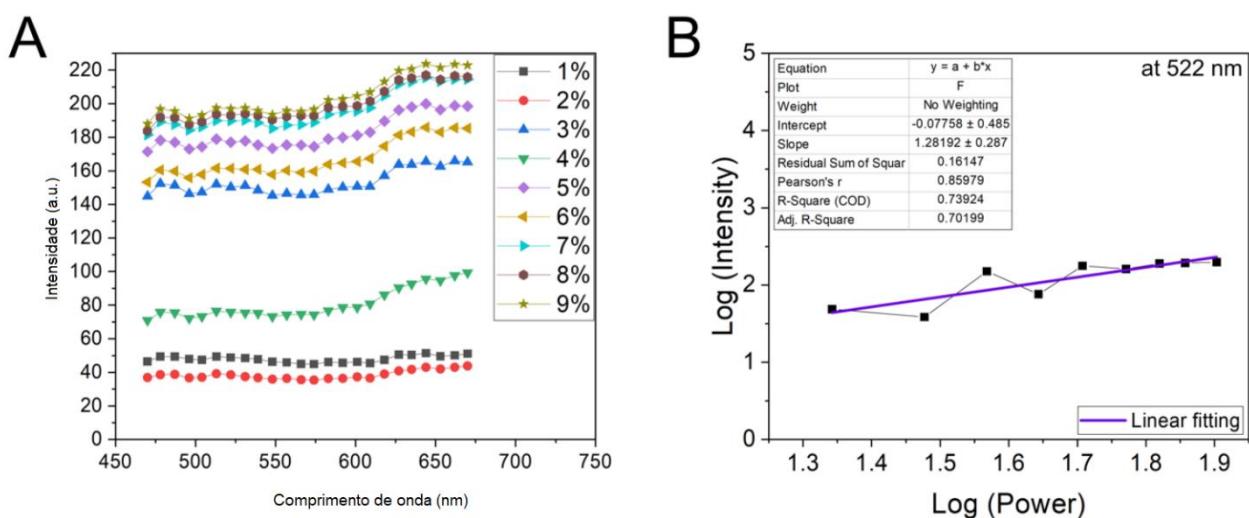


Figura 4

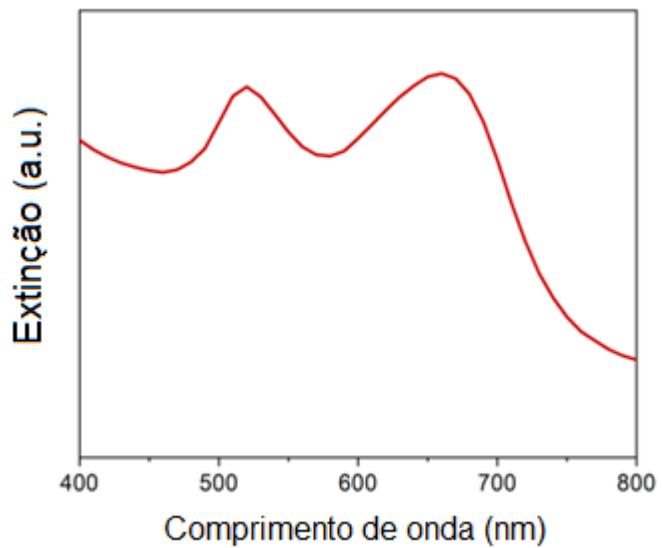


Figura 5

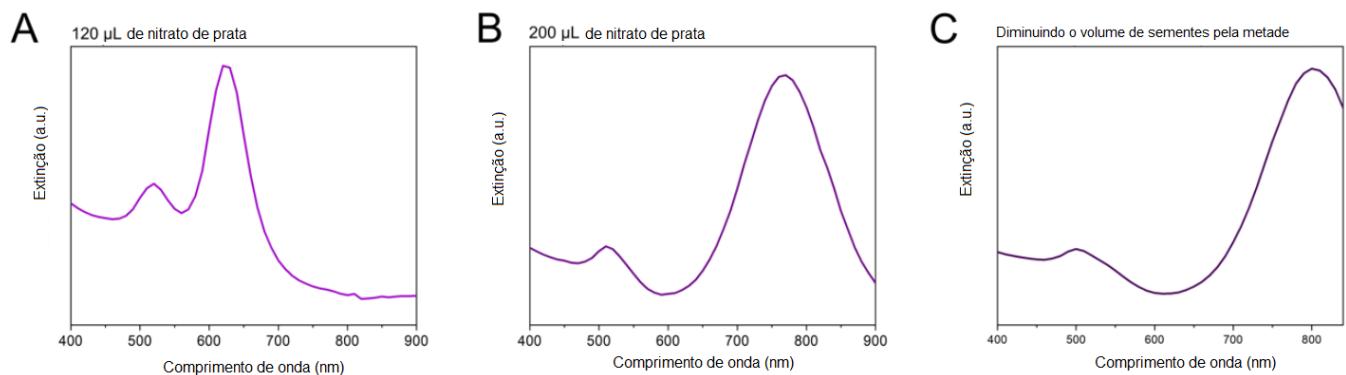


Figura 6

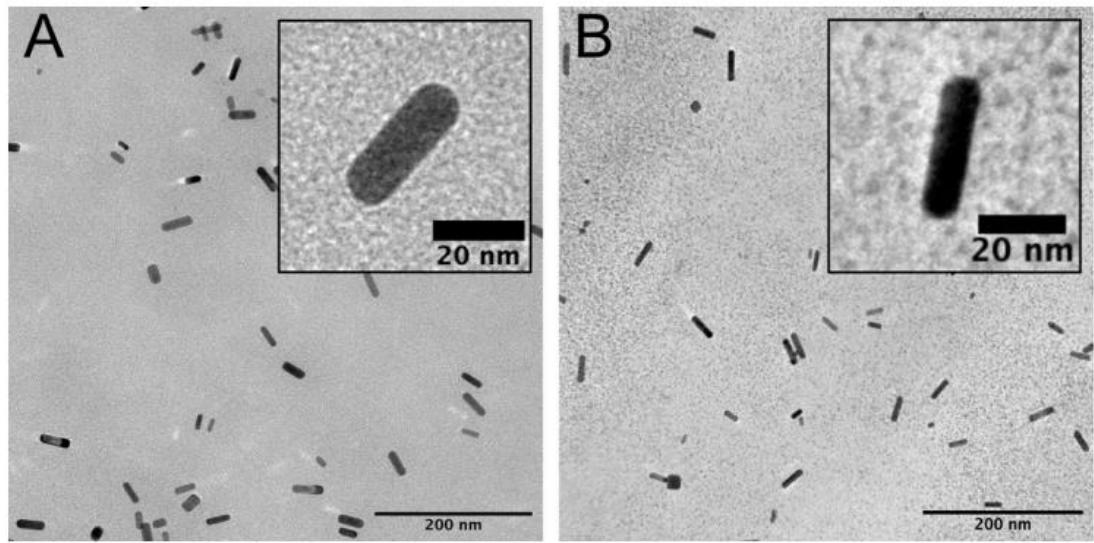


Figura 7

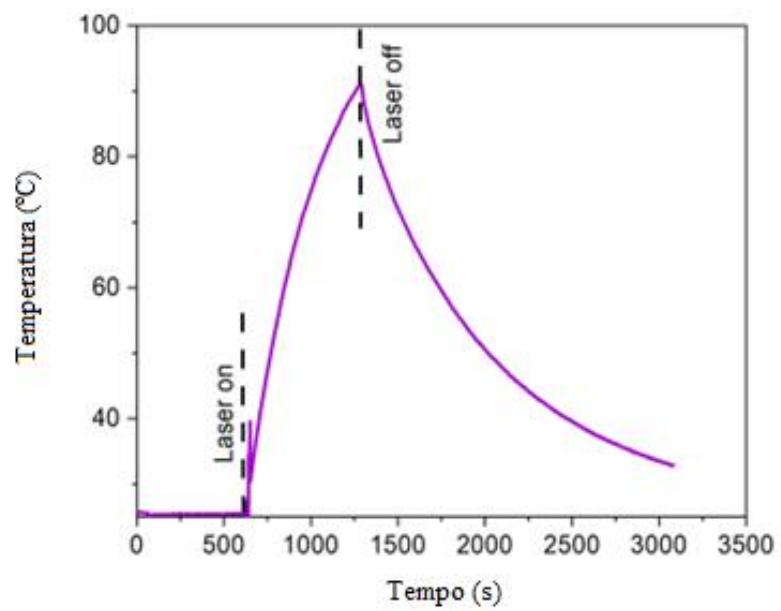


Figura 8

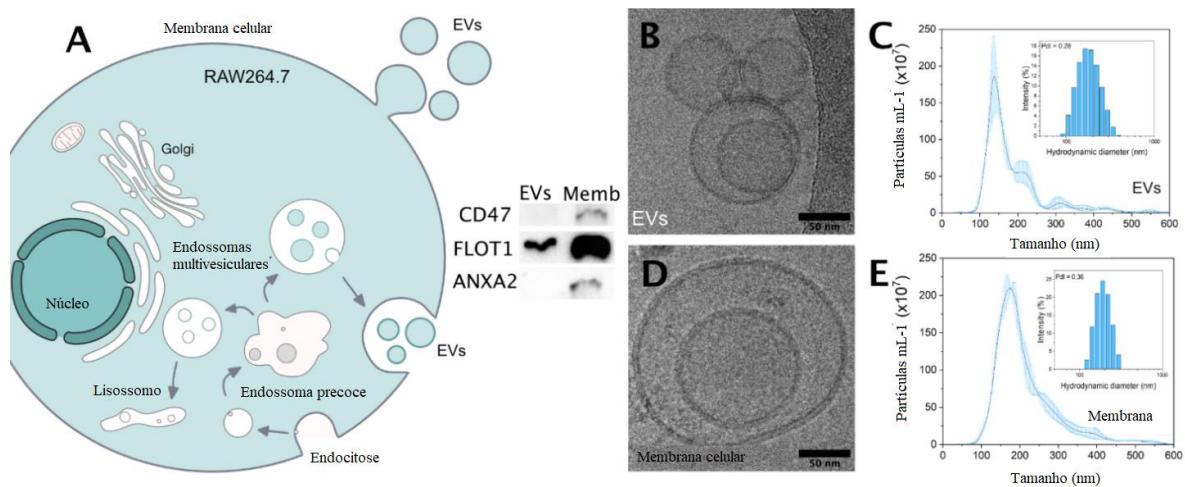


Figura 9

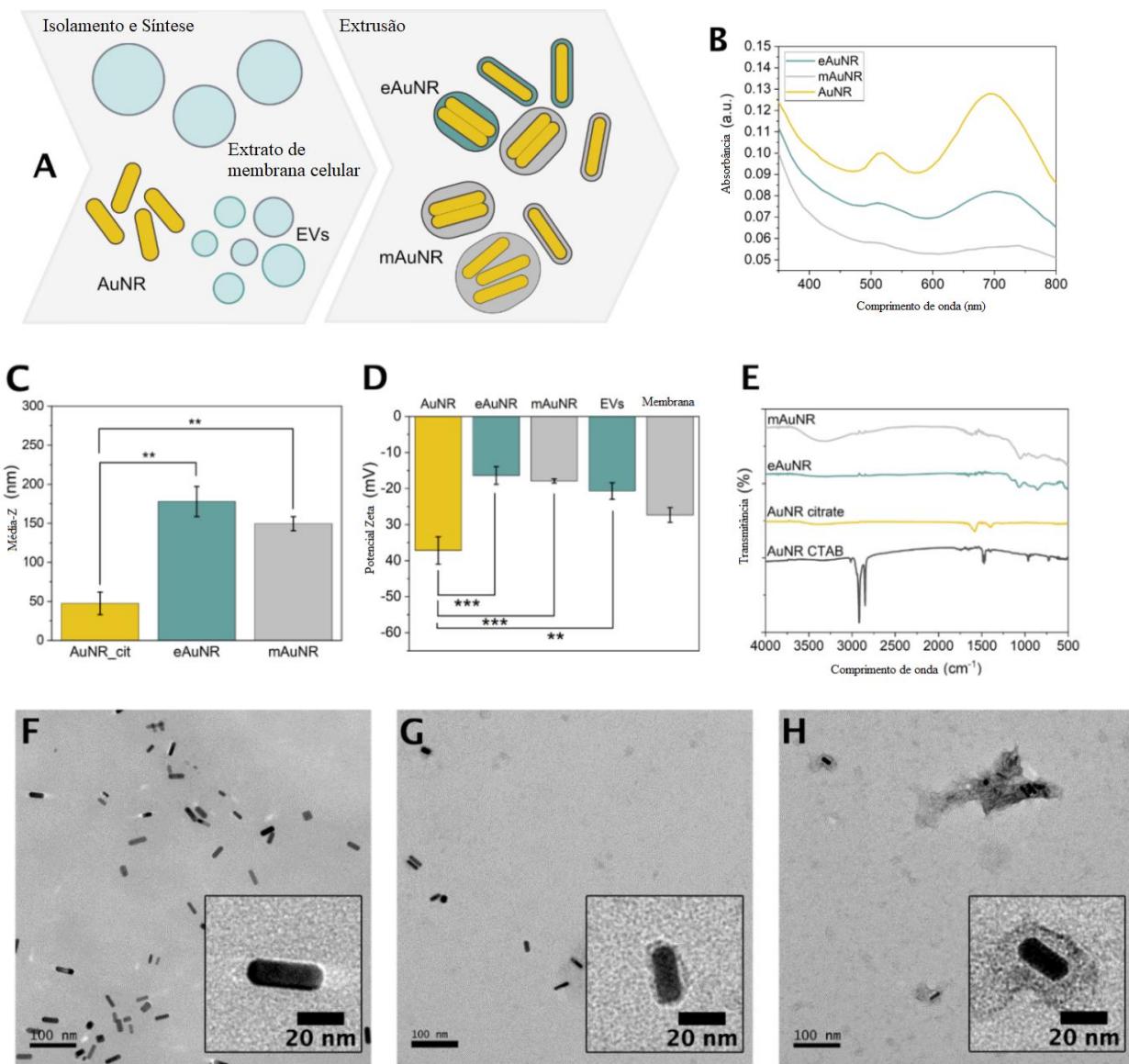


Figura 10

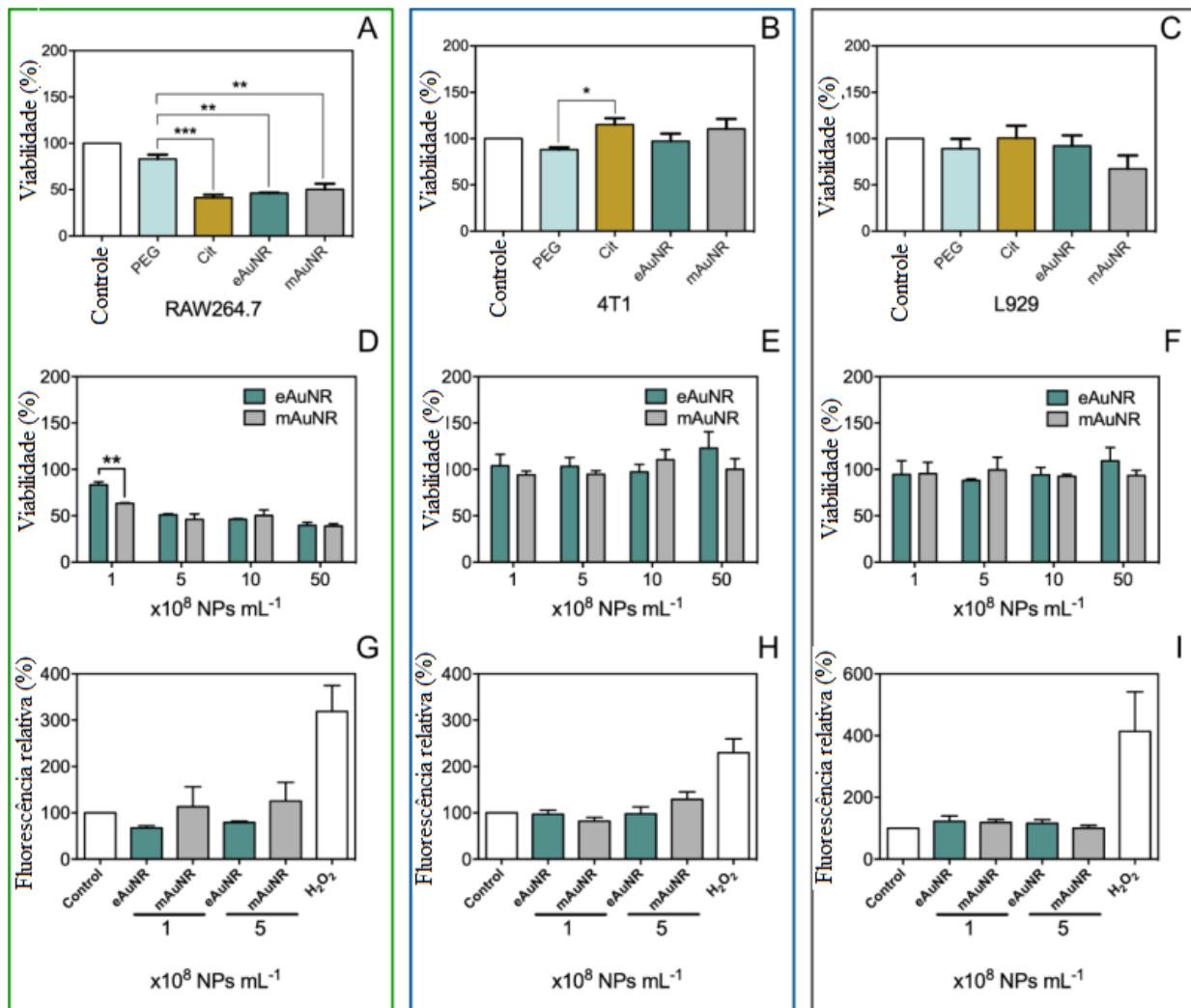


Figura 11

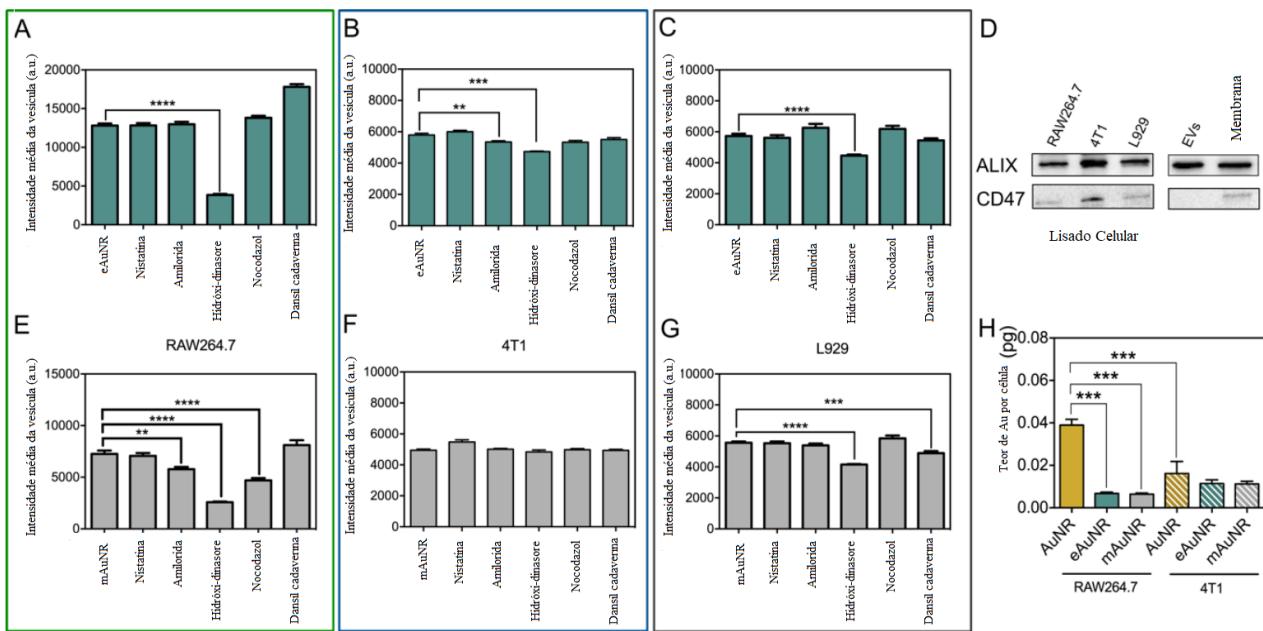


Figura 12

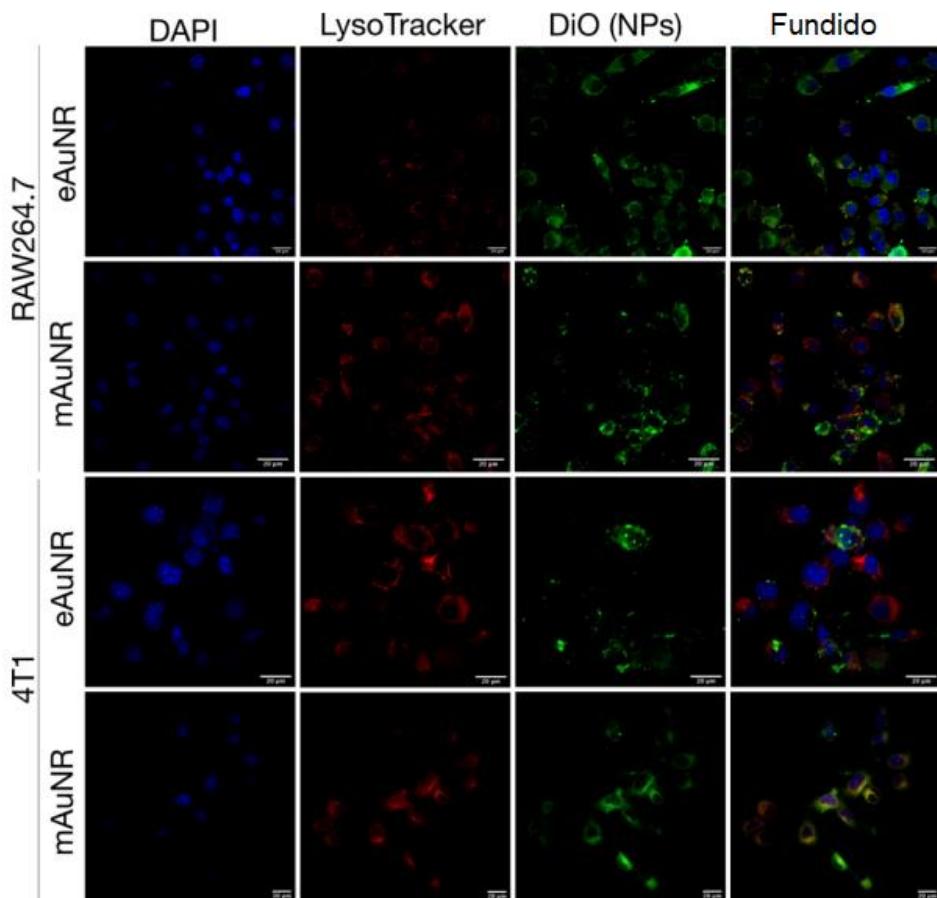


Figura 13

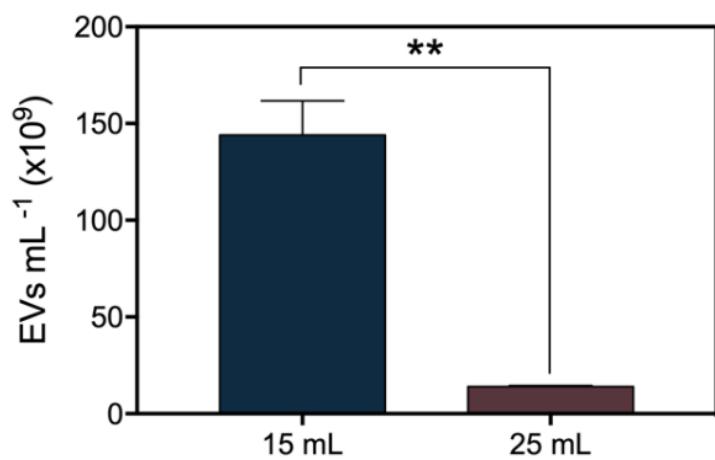


Figura 14

eAuNR

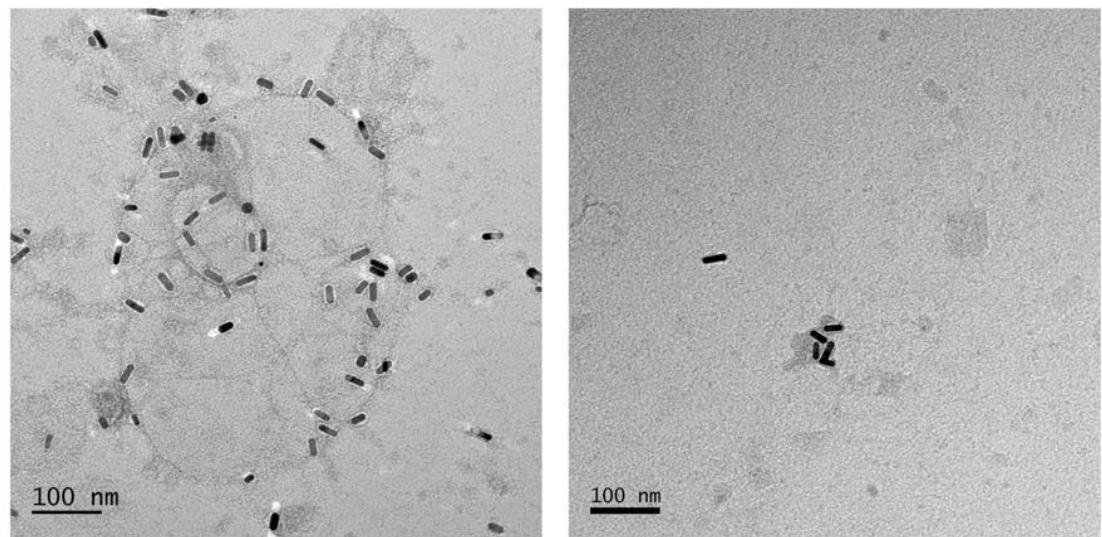


Figura 15

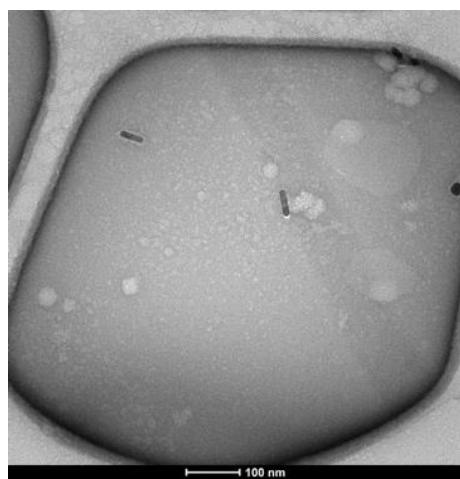


Figura 16

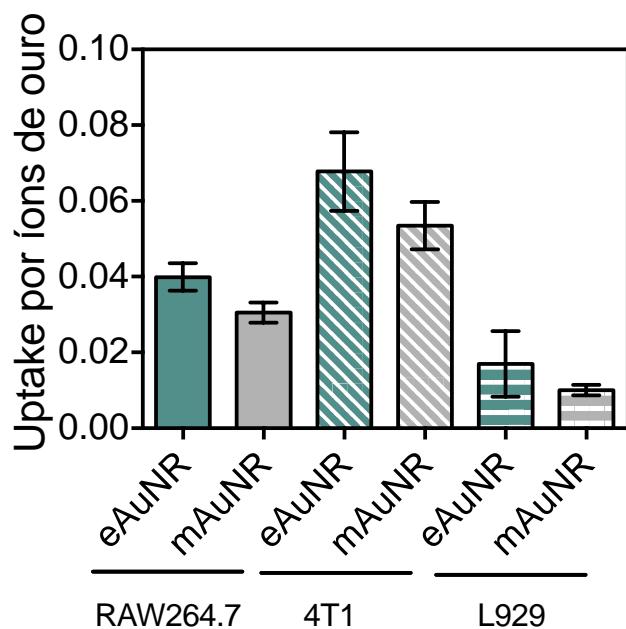


Figura 17

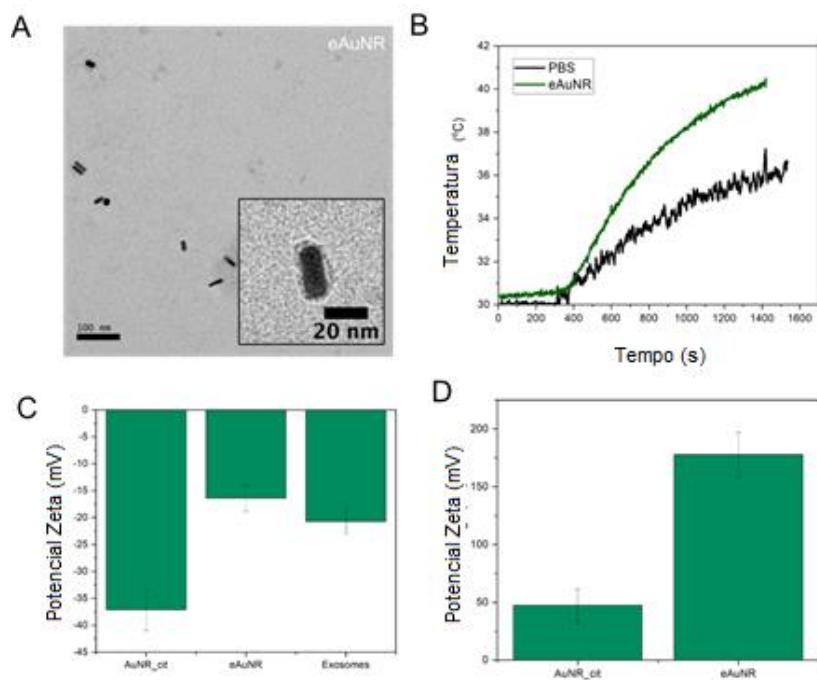


Figura 18

RESUMO**PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO****PARA A PREPARAÇÃO DESTA E USO DA PLATAFORMA**

A presente invenção refere-se a uma plataforma nanoestruturada revestida com vesículas extracelulares e/ou membranas celulares para aplicação em terapia fototérmica. A nanopartícula da invenção compreende a) um núcleo interno constituído de um nanomaterial plasmônico, como nanobastões de ouro; e b) uma superfície externa elaborada de vesículas extracelulares e/ou membranas celulares derivadas de célula de macrófago. A presente invenção descreve um método para fabricação da plataforma nanoestruturada. Além disso, é descrito o uso da plataforma nanoestruturada em conjunto com um fármaco antitumoral na fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer.