

Trabalho

Título em Português:	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS CONTENDO TEMOZOLOMIDA PARA O TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA
Título em Inglês:	Therapeutic Performance of Biomimetic Nanoparticles Containing Temozolomide for Glioblastoma Treatment
Autor:	Marcela Eduarda Hernandes Oliveira
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Valtencir Zucolotto
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biotecnologia
Agência Financiadora:	CNPq - PIBIC

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS CONTENDO TEMOZOLOMIDA PARA O TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA

Marcela Eduarda Hernandez Oliveira

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo/Instituto de Física de São Carlos

marcelaeho@estudante.ufscar.br

Objetivos

Segundo dados do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), estima-se que, até 2040, ocorrerão aproximadamente 28,4 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo – um aumento de cerca de 47% em relação ao ano de 2020. Apesar dos expressivos avanços científicos e do elevado investimento financeiro na área, o câncer permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade global, afetando indivíduos de todas as faixas etárias e representando um dos maiores desafios enfrentados pela medicina contemporânea. Nesse contexto, a nanomedicina se destaca como uma ferramenta promissora de estratégias terapêuticas avançadas, superando limitações frequentes dos tratamentos convencionais. Entre os avanços da nanoengenharia, se destaca a modificação superficial de nanopartículas utilizando membranas celulares. Essa abordagem bioinspirada e biomimética confere às nanoestruturas camuflagem frente ao sistema imunológico e promove acúmulo seletivo no microambiente tumoral. Essas nanoplateformas visam favorecer a vetorização sítio-específica para a região tumoral através do reconhecimento homotípico, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e aumentando a efetividade terapêutica. Neste projeto, sistemas biomiméticos estruturados baseados em PLGA carregados com temozolomida (TMZ) foram estudados quanto ao seu desempenho biológico utilizando protocolos *in vitro*.

Métodos e Procedimentos

Neste estudo, NPs de PLGA carregadas com TMZ foram sintetizadas pelo método de emulsão dupla e evaporação de solventes, utilizando PLGA dissolvido em diclorometano e TMZ em acetona, emulsificados em solução de álcool polivinílico por sonicação. As NPs foram lavadas com filtros Amicon (100 kDa). Paralelamente, foram cultivadas células de glioma (U251) e linfócitos T, as quais tiveram suas membranas plasmáticas isoladas por ultracentrifugação, após lise celular em tampão hipotônico. As membranas obtidas foram quantificadas (ensaio BCA) e hibridizadas por extrusão conjunta em membranas de polycarbonato (200 nm), originando membranas híbridas. A caracterização físico-química das NPs e membranas incluiu medidas de tamanho, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta via espalhamento dinâmico de luz (DLS) e rastreamento de nanopartículas (NTA). A performance biológica foi avaliada *in vitro* em células tumorais (U251, U87) e não tumorais (HDFn), por ensaio de viabilidade com MTT e exclusão por azul de Trypan, após 72h de incubação. Para análise do ciclo celular, as células passaram pelos diferentes tratamentos com NPs, foram fixadas em etanol e tratadas com iodeto de propídio e RNase A, e analisadas por citometria de fluxo. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional ou bidirecional, seguida do teste de Tukey.

Resultados

A tabela abaixo apresenta as características físico-químicas das amostras, determinadas por meio das técnicas de caracterização citadas

Linhagem celular	DLS			NTA	BCA
	Tamanho hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Concentração de proteínas (µg/mL)
U251	926,4 ± 666,4	0,85 ± 0,25	-38,8 ± 2,6	173,3 ± 5,5	20,7 ± 14,6
Jurkat	803,3 ± 364,8	0,86 ± 0,23	-39,1 ± 1,7	224,8 ± 22,9	193,8 ± 10,1

Tabela 1. Parâmetros de caracterização

Fonte: Autoria própria. 2025

As formulações nanoparticuladas não apresentaram efeitos citotóxicos significativos sobre células não tumorais (HDFn), porém reduziram a atividade metabólica em HepaRG, sugerindo papel relevante das membranas na modulação da atividade. Em células U251 não houve diferença estatística significativa na integridade de membranas entre os tratamentos aplicados, contudo, os nanossistemas impactaram mais expressivamente a atividade metabólica. Nos ensaios com linhagem U87, a formulação NP-Mix destacou-se como mais eficiente na redução da viabilidade celular.

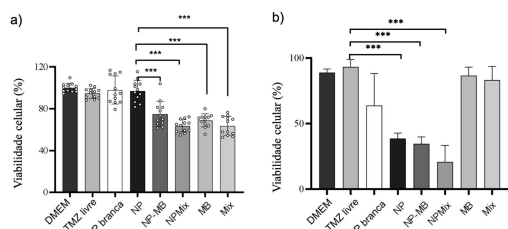


Figura 1. Ensaio de viabilidade em U87

Fonte: Autoria própria. 2025

Na linhagem HCB 151, NP, NP-MB e NP-Mix comprometeram significativamente a integridade da membrana celular.

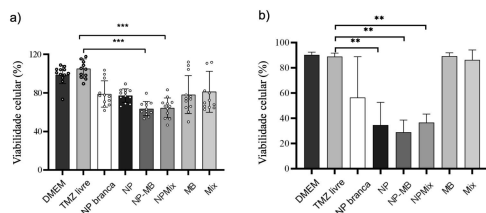


Figura 2. Ensaio de viabilidade em HCB 151

Fonte: Autoria própria. 2025

Ainda, os resultados indicam que o tratamento com membrana híbrida interfere diretamente no ciclo celular, promovendo acúmulo de células em G2/M e reduzindo a progressão para a fase S, o que sugere potencial efeito antiproliferativo. Por outro lado, os demais tratamentos não demonstraram impacto estatisticamente significativo.

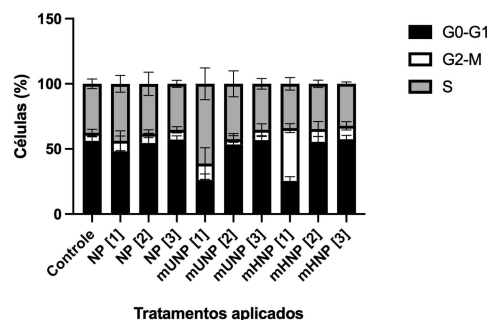


Figura 3. Ensaio de ciclo celular

Fonte: Autoria própria. 2025

Conclusões

A presença de membranas celulares potencializou os efeitos das nanopartículas sobre a atividade metabólica em todas as linhagens tumorais, quando comparadas com o tratamento de TMZ livre. As nanopartículas brancas e as carregadas com TMZ exibiram efeitos similares sobre a atividade metabólica, entretanto, as partículas com TMZ induziram maior comprometimento da integridade da membrana em U87 e HCB 151, indicando um efeito citotóxico diferencial nestas linhagens tumorais. Os achados do ciclo celular destacam o tratamento com membrana híbrida em relação às demais condições testadas.

Referências

- FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021
- ARORA, A.; SOMASUNDARAM, K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc., 2019.
- FERREIRA, N. N. et al. A novel strategy for glioblastoma treatment combining alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid with cetuximab using nanotechnology-based delivery systems. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 10, n. 3, p. 594–609, 2020.

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC PERFORMANCE OF BIOMIMETIC NANOPARTICLES CONTAINING TEMOZOLOMIDE FOR THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA

Marcela Eduarda Hernandes Oliveira

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

University of São Paulo/São Carlos Institute of Physics

marcelaeho@estudante.ufscar.br

Objectives

According to data from the Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), it is estimated that by 2040 there will be approximately 28.4 million new cancer cases worldwide—an increase of about 47% compared to 2020. Despite significant scientific advances and substantial financial investment in the field, cancer remains one of the leading causes of global morbidity and mortality, affecting individuals across all age groups and representing one of the greatest challenges faced by contemporary medicine. In this context, nanomedicine stands out as a promising tool for advanced therapeutic strategies, overcoming frequent limitations of conventional treatments. Among the advances in nanoengineering, the surface modification of nanoparticles using cell membranes is particularly noteworthy. This bioinspired and biomimetic approach provides nanostructures with camouflage against the immune system and promotes selective accumulation in the tumor microenvironment. Such nanoplateforms aim to enhance site-specific targeting of the tumor region through homotypic recognition, thereby minimizing systemic side effects and increasing therapeutic effectiveness. In this project, biomimetic PLGA-based systems loaded with temozolomide (TMZ) were studied regarding their biological performance using *in vitro* protocols.

Methods and Procedures

In this study, PLGA NPs loaded with TMZ were synthesized using the double emulsion and solvent evaporation method, with PLGA dissolved in dichloromethane and TMZ in acetone, emulsified in a polyvinyl alcohol solution by sonication. The NPs were washed using Amicon filters (100 kDa). In parallel, glioma cells (U251) and T lymphocytes were cultured, and their plasma membranes were isolated by ultracentrifugation following cell lysis in hypotonic buffer. The obtained membranes were quantified (BCA assay) and hybridized through co-extrusion using polycarbonate membranes (200 nm), resulting in hybrid membranes. Physicochemical characterization of the NPs and membranes included measurements of size, polydispersity index (PDI), and zeta potential via dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). Biological performance was evaluated *in vitro* in tumor cells (U251, U87) and non-tumor cells (HDFn) through viability assays using MTT and Trypan Blue exclusion after 72 h of incubation. For cell cycle analysis, cells subjected to different NP treatments were fixed in ethanol, treated with propidium iodide and RNase A, and analyzed by flow cytometry. All assays were performed in triplicate. Differences between experimental groups were compared using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test.

Results

The table below presents the physical and chemical characteristics of the samples, determined using the aforementioned characterization techniques.

Linhagem celular	DLS			NTA	BCA
	Tamanho hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Concentração de proteínas (µg/mL)
U251	926,4 ± 666,4	0,85 ± 0,25	-38,8 ± 2,6	173,3 ± 5,5	20,7 ± 14,6
Jurkat	803,3 ± 364,8	0,86 ± 0,23	-39,1 ± 1,7	224,8 ± 22,9	193,8 ± 10,1

Table 1. Characterization Parameters
Source: Own authorship. 2025

The nanoparticle formulations did not exhibit significant cytotoxic effects on non-tumor cells (HDFn), but reduced metabolic activity in HepaRG, suggesting a relevant role for membranes in modulating activity. In U251 cells, there was no statistically significant difference in membrane integrity between treatments; however, the nanosystems had a more significant impact on metabolic activity. In assays with the U87 cell line, the NP-Mix formulation stood out as the most effective in reducing cell viability.

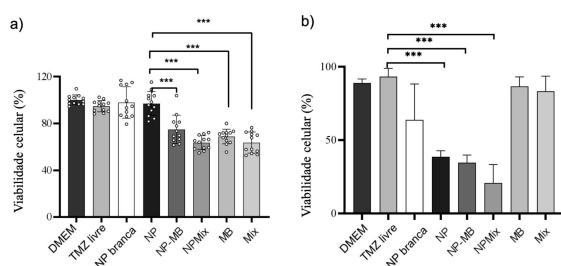


Figure 1. U87 viability test
Source: Own authorship. 2025

In the HCB 151 cell line, NP, NP-MB and NP-Mix significantly compromised the integrity of the cell membrane..

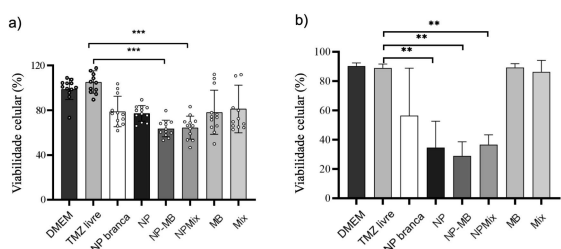


Figure 2. Viability test in HCB 151
Source: Own authorship. 2025

Furthermore, the results indicate that hybrid membrane treatment directly interferes with the cell cycle, promoting cell accumulation in G2/M and reducing progression to S phase, suggesting a potential antiproliferative effect. On the other hand, the other treatments did not demonstrate a statistically significant impact.

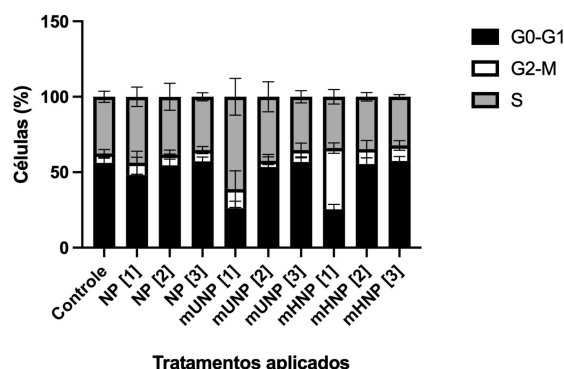


Figure 3. Cell cycle assay
Source: Own authorship. 2025

Conclusions

The presence of cell membranes potentiated the effects of nanoparticles on metabolic activity in all tumor cell lines, compared with free TMZ treatment. Blank and TMZ-loaded nanoparticles exhibited similar effects on metabolic activity; however, TMZ-loaded particles induced greater impairment of membrane integrity in U87 and HCB 151, indicating a differential cytotoxic effect in these tumor cell lines. The cell cycle findings highlight the hybrid membrane treatment in relation to the other conditions tested.

References

- FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021
- ARORA, A.; SOMASUNDARAM, K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc., 2019.
- FERREIRA, N. N. et al. A novel strategy for glioblastoma treatment combining alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid with cetuximab using nanotechnology-based delivery systems. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 10, n. 3, p. 594–609, 2020.