

Título em Português: Nanopartículas biomiméticas para a entrega de paclitaxel na terapia de câncer de pulmão

Título em Inglês: Biomimetic nanoparticles for paclitaxel delivery in lung cancer therapy

Autor: Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Valtencir Zucolotto

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Biotecnologia

Agência Financiadora: CNPq - PIBITI

NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS PARA A ENTREGA DE PACLITAXEL NA TERAPIA DE CÂNCER DE PULMÃO

Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Celisnolia M. Leite e Camila F. Rodero

Valtencir Zucolotto

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

lorany.vitoria@usp.br

Objetivos

Desenvolver um nanossistema biomimético à base do copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), contendo paclitaxel (PTX) e revestido com membranas extraídas da linhagem celular humana A549, derivada de câncer de pulmão, como uma alternativa para o tratamento do câncer de pulmão.

Métodos e Procedimentos

Extração da membrana celular (MC): a MC foi isolada e purificada por lise celular e ultracentrifugação. O pellet com as membranas foi ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) com inibidor de protease e armazenado a -80°C. **Síntese das nanopartículas (NPs):** as NPs foram sintetizadas pelos métodos de nanoprecipitação e nanoemulsão. Para tanto, treze formulações por nanoprecipitação e seis por nanoemulsão foram testadas, variando-se diferentes parâmetros de síntese.

Eficiência de encapsulação (EE) do PTX: a melhor síntese foi ultracentrifugada e o seu pellet foi ressuspenso em PBS. O sobrenadante foi recolhido para medidas indiretas de EE do PTX via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Revestimento das nanopartículas com a MC:** as NPs foram revestidas com a MC sob banho de sonicação a 15°C, 80W de potência e 37kHz. **Caracterização das nanopartículas:** a

MC, NPs com e sem MC foram caracterizadas por dispersão dinâmica da luz (DLS), mobilidade eletroforética e rastreamento de NPs (NTA). Também foram caracterizadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A integridade da MC foi avaliada pela concentração de proteínas, através do ensaio de ácido bicinonínico (BCA). A estabilidade das NPs com MC foi monitorada por 7 semanas. **Avaliação biológica:** a citotoxicidade dos nanossistemas foi avaliada frente à linhagem tumoral A549 pelo método colorimétrico do MTT.

Resultados

O processo de extração mostrou-se adequado para a obtenção das MCs que apresentaram tamanho médio de 290 ± 10 nm (DLS) e 230 ± 10 (NTA), índice de polidispersão (PDI) $0,5 \pm 0,1$ e um potencial Zeta (PZ) de -31 ± 2 mV, com concentração na ordem de 10^{11} partículas/mL. O ensaio de BCA revelou uma concentração de proteínas em torno de $0,12 \pm 0,08$ mg/mL. Esses resultados estão de acordo com outro estudo realizado em nosso grupo [1] e são importantes para determinar a integridade da MC.

Com relação à síntese, apenas o método de nanoemulsão foi bem-sucedido para a obtenção de NPs contendo o PTX, sendo que o nanossistema com os melhores parâmetros de tamanho e PZ prosseguiu para a etapa de caracterização e revestimento com as MCs. Os

resultados obtidos para as NPs estão expostos na Tabela 1, sendo 60±10% a EE para as NPs com PTX.

Tabela 1 - Caracterização das NPs sem MC (NPBR e NPPTX) e com MC (NPBR+MC e NPPTX+MC): tamanho (nm), PDI e PZ (mV).

	NTA (nm)	DLS (nm)	PDI	PZ (mV)
NPBR	149±3	220±10	0,36±0,02	- 12±1
NPBR+MC	191±3	240±30	0,40±0,06	- 21±3
NPPTX	155±4	214±7	0,31±0,06	- 15±1
NPPTX+MC	170±3	290±20	0,49±0,02	- 23±4

Os valores de tamanho e PDI para NPBR+MC e NPPTX+MC são maiores do que os de NPBR e NPPTX, e os de PZ são menores. Esses resultados são indicativos do revestimento das NPs com as MCs.

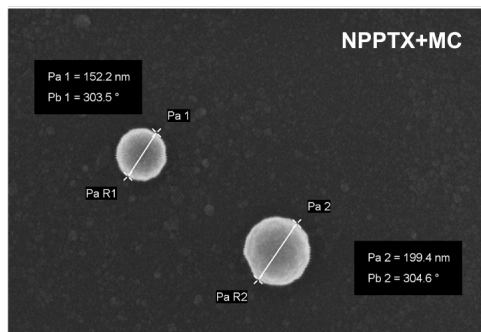


Figura 1 - Imagem obtidas por MEV da NPPTX+MC, demonstrando alguns valores de tamanho obtidos por meio desta técnica (152,2 e 199,4 nm).

As NPs com MC demonstram boa estabilidade durante 3 semanas, além de uma morfologia esférica, com pequenas rugosidades (Figura 1). O diâmetro obtido por MEV confirma que as NPs estão na faixa de tamanho adequado, visto que, entre 20 e 200 nm, estas são capazes de se acumular no espaço intersticial [2]. Os resultados *in vitro* indicaram que as NPs sem PTX são biocompatíveis, pois não foram citotóxicas (Figura 2). As NPs com PTX reduziram a viabilidade conforme o aumento na

concentração de PTX, sendo a NPPTX+MC mais citotóxica do que a NPPTX, resultado compatível com o de Zhou et al, 2024 [3].

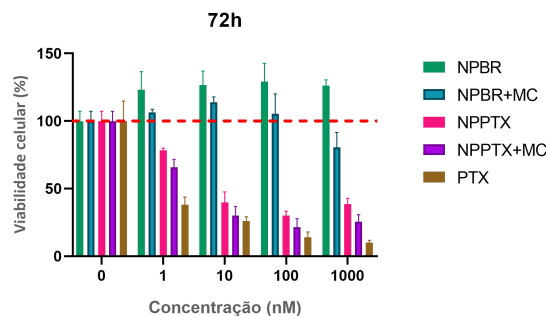


Figura 2 - Gráfico de viabilidade celular de 72h. As quatro NPs e fármaco livre (PTX) foram testadas em 5 concentrações distintas de PTX (0 a 1000 nM).

Conclusões

Este estudo mostrou que as NPs biomiméticas têm potencial significativo para aumentar a eficácia da quimioterapia contra o câncer de pulmão, indicando um caminho em direção a terapias inteligentes e personalizáveis.

Agradecimentos

CNPq (# 2023-2528), FAPESP e Capes.

Referências

- [1] FERREIRA, Natália Noronha et al. Using design of experiments (DoE) to optimize performance and stability of biomimetic cell membrane-coated nanostructures for cancer therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1120179, 2023.
- [2] DANHIER, Fabienne; FERON, Olivier; PRÉAT, Véronique. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.
- [3] ZHOU, Jiahan et al. Cancer cell membrane-camouflaged paclitaxel/PLGA nanoparticles for targeted therapy against lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 117102, 2024.

BIOMIMETIC NANOPARTICLES FOR PACLITAXEL DELIVERY IN LUNG CANCER THERAPY

Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Celislolia M. Leite and Camila F. Roderio

Valtencir Zucolotto

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo

lorany.vitoria@usp.br

Objectives

To develop a biomimetic nanosystem based on the copolymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), containing paclitaxel (PTX) and coated with membranes extracted from the human A549 cell line, derived from lung cancer, as an alternative for lung cancer treatment.

Materials and Methods

Cellular membrane (CM) Extraction: CMs were isolated and purified using cell lysis, followed by ultracentrifugation. The membrane-containing pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with a protease inhibitor and stored at -80°C . **Nanoparticles (NPs) synthesis:** NPs were synthesized using nanoprecipitation and nanoemulsion methods. Thirteen nanoprecipitation formulations and six nanoemulsion formulations were tested with different synthesis parameters.

PTX encapsulation efficiency (EE): the optimized synthesis was ultracentrifuged, and its pellet was resuspended in PBS. The supernatant was collected for indirect measurements of PTX EE via high-performance liquid chromatography (HPLC). **Coating of nanoparticles with CM:** NPs were coated with CM under sonication at 15°C , with a power of 80W and a frequency of 37 kHz. **Nanoparticles**

characterization: CM-coated and uncoated nanoparticles were characterized using dynamic light scattering (DLS), electrophoretic mobility, and NP tracking analysis (NTA). Scanning electron microscopy (SEM) was employed for morphological characterization. The integrity of the CM was determined by protein quantification through bicinchoninic acid (BCA) assay. The stability of the CM-coated NPs was monitored over seven weeks. **Biological evaluation:** the cytotoxicity of the nanosystems was evaluated using the MTT colorimetric assay against the A549 tumor cell line.

Results

The extraction process was found to be effective for obtaining CMs, which exhibited an average size of 290 ± 10 nm (DLS) and 230 ± 10 (NTA), with a polydispersity index (PDI) of 0.5 ± 0.1 and a Zeta potential (ZP) of -31 ± 2 mV. The particle was approximately 10^{11} particles/mL. The BCA assay revealed a protein concentration of 0.12 ± 0.08 mg/mL. These results are consistent with previous research conducted by our group [1] and are essential for determining the integrity of the CM. Regarding nanoparticle synthesis, only the nanoemulsion method successfully encapsulated PTX. The resulting nanosystem demonstrated optimal size and ZP parameters, allowing it to proceed to characterization and

CM coating. The results for the NPs are summarized in Table 1, with an EE of 60±10% for the NPs with PTX.

Table 1 - Characterization of NPs without CM (NPBR and NPPTX) and with CM (NPBR+CM and NPPTX+CM): size (nm), PDI and ZP (mV).

	NTA (nm)	DLS (nm)	PDI	ZP (mV)
NPBR	149±3	220±10	0,36±0,02	-12±1
NPBR+CM	191±3	240±30	0,40±0,06	-21±3
NPPTX	155±4	214±7	0,31±0,06	-15±1
NPPTX+CM	170±3	290±20	0,49±0,02	-23±4

The size and PDI values for NPBR+CM and NPPTX+CM are higher than those for NPBR and NPPTX, while the ZP values are lower. These results indicate the coating of the NPs with CMs.

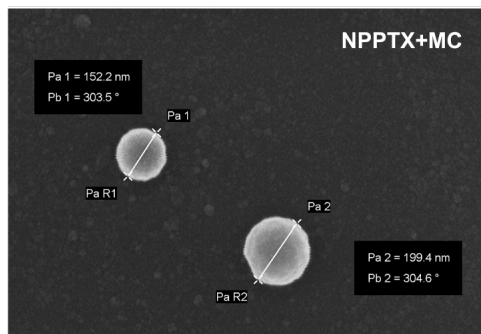


Figure 1: SEM image of NPPTX+CM, showing some values obtained using this technique (152.2 and 199.4 nm).

NPs with CM demonstrated good stability over three weeks and a spherical morphology with slight roughness (Figure 1). The diameter obtained by SEM confirms that the NPs are within the appropriate size range, as particles between 20 and 200 nm can accumulate in the interstitial space [2]. The *in vitro* results indicated that NPs without PTX are biocompatible, as they were not cytotoxic (Figure 2). NPs with PTX reduced cell viability with increasing PTX concentration, with

NPPTX+CM being more cytotoxic than NPPTX, consistent with Zhou et al., 2024 [3].

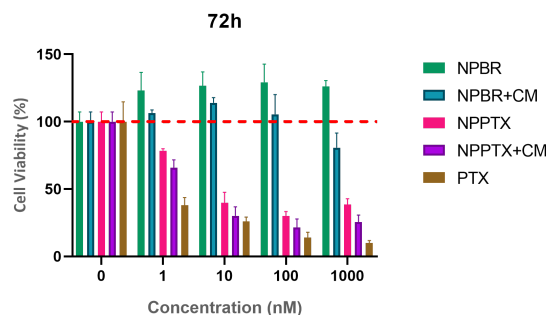


Figure 2 - Graph of 72-hour cell viability. The four NPs and free drug (PTX) were tested at 5 different PTX concentrations (0 to 1000 nM).

Conclusions

This study demonstrates that biomimetic NPs have significant potential to enhance the efficacy of chemotherapy against lung cancer, paving the way for smart and customizable therapies.

Acknowledgments

CNPq (# 2023-2528), FAPESP e Capes.

References

- [1] FERREIRA, Natália Noronha et al. Using design of experiments (DoE) to optimize performance and stability of biomimetic cell membrane-coated nanostructures for cancer therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1120179, 2023.
- [2] DANHIER, Fabienne; FERON, Olivier; PRÉAT, Véronique. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.
- [3] ZHOU, Jiahua, et al. Cancer cell membrane-camouflaged paclitaxel/PLGA nanoparticles for targeted therapy against lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 117102, 2024.