

O Papel de Parâmetros Estruturais na Internalização Celular de Sistemas Poliméricos Nanoestruturados

Carlos Eduardo de Castro¹, Fabiane Lucy Ferreira Castro¹, Maria Cristina Carlan da Silva¹ e Fernando Carlos Giacomelli¹

¹ Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas. Av. dos Estados, 5001- Bloco A, torre 3, sala L-704-3, Bairro Bangu, CEP 09210-580, Santo André – SP- Email: (fernando.giacomelli@ufabc.edu.br).

RESUMO

O emprego de nanopartículas poliméricas a base de matéria mole têm múltiplas vantagens, destacando-se a de circularem por longo tempo no organismo, sendo capazes de atuar em determinados tratamentos e prevenção de doenças pelo fato de possuírem tamanho similar a biomoléculas. Neste trabalho utilizamos nanopartículas formadas por copolímeros de PLA (poli ácido láctico), PEO (polioxietileno) e PCL (policaprolactona), esquematicamente demonstrado como PLA_m -b- PEO_n e PCL_m -b- PEO_n , e o copoliéster PLGA poli (ácido láctico-co-glicólico), os quais através da técnica de nanoprecipitação, formaram nanopartículas de diferentes características físico-químicas, variando em função da fração volumétrica do solvente orgânico. Esses parâmetros influenciaram diretamente no perfil de internalização celular em células de Glioblastoma U251. Foi demonstrado que o tamanho da coroa hidrofílica e a natureza do núcleo hidrofóbico são os principais fatores que influenciam a adesão e captura pelas células.

Palavras-Chave: nanomedicina, coloides e interfaces, liberação de fármacos.

INTRODUÇÃO

A utilização de sistemas nanoestruturados à base de matéria mole (polímeros) que têm se difundido de maneira acelerada em que pese às aplicações biomédicas e constituem sistemas que podem acomodar em seu interior um enorme número de diferentes agentes ativos. Essa tecnologia vem recebendo tamanha atenção devido à sua versatilidade, pelo fato de suas características estruturais poderem ser modificadas mediante modificação do protocolo de fabricação e pelo fato de poderem responder a estímulos externos ou fisiológicos específicos (LEE; HYEON, 2012). Geralmente, nanocarreadores (com tamanho entre 20-100nm) possuem dimensões adequadas para atravessarem a vasculatura desorganizada e porosa das regiões tumorais. Além disso, os vasos linfáticos estão ausentes ou não funcionais nestes locais, contribuindo para uma ineficiente drenagem. Este fenômeno é conhecido como efeito do aumento da permeabilidade e retenção (efeito EPR) (MAEDA; WU; MATSUMURA, 2000). A interação de nanopartículas com sistemas biológicos promovem a formação de uma nanobiointerface, onde forças de van der Waals (VDW), eletrostáticas, hidratação e efeitos solvo fóbicos desempenham papel fundamental. Principalmente o processo de interação NP-membrana celular inevitavelmente afeta o processo de absorção celular de sistemas carreadores

de agentes ativos (*drug delivery*). A interação NP-membrana depende das características físico-químicas da membrana celular e também da estrutura do sistema nanométrico, ou seja, do seu tamanho, forma, natureza química, rugosidade e hidrofobicidade. Esses fatores podem aumentar ou diminuir a adesão e internalização, que podem ocorrer pela endocitose mediada por clatrina, que permite a internalização de sistemas menores de 300 nm, ou por caveolina (< 80nm). Levando-se em conta as considerações supracitadas, no presente projeto procurou-se compreender como as características estruturais de sistemas poliméricos dimensionados na escala nanométrica afetam o processo de internalização celular dos mesmos. Os resultados podem futuramente contribuir para a fabricação de sistemas de entrega de fármacos e terapias contra o câncer mais eficazes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sistemas anfífilos de copolímeros em bloco contendo um bloco hidrofóbico (PLA, PCL) ligado quimicamente a um bloco hidrofílico (PEO) além do copoliéster PLGA (não anfílico). As NPs foram preparadas pelo método de nanoprecipitação a partir de soluções poliméricas em estoque preparadas em diferentes solventes (acetona, THF ou misturas de acetona:THF). Os polímeros pré-formados foram dissolvidos em solvente orgânico juntamente com a sonda fluorescente cumarina-6. Soluções poliméricas na concentração final constante ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) na razão solvente:água 0,4 foram preparadas partindo-se de 5,0 mg dos polímeros supracitados. A determinação semi-quantitativa da absorção celular das nanopartículas foi realizado através de medidas de microscopia de fluorescência confocal bem elucidado em protocolo segundo ZHANG et al., 2014. As células foram crescidas por 24 hs. Posteriormente, estas foram incubadas por de 2 horas com as NPS e em seguida as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS no intuito de se remover nanopartículas não internalizadas. As células foram posteriormente observadas utilizando-se um microscópio de fluorescência confocal Zeiss LSM 510-meta, em magnificação de 63X.

Para caracterização das nanopartículas foram utilizadas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), estático (SLS) e eletroforético (ELS) de acordo com CASTRO et al., 2014 com pequenas modificações. As medidas de ELS foram realizadas para determinar o potencial- ζ das NPs. A análise morfológica teve como intuito verificar a forma dos objetos produzidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de espalhamento de luz demonstram que à medida que a fração volumétrica de THF (ϕ_{THF}) aumenta, NPs maiores são produzidas. A explicação mais aceita para este fenômeno está relacionada com a velocidade de homogeneização meio orgânico-meio aquoso, e este fator determina o tamanho final das nanopartículas, como pode ser observado nas Figuras I A e I B. No que tange o potencial- ζ , como pode ser observado na figura I C, as NPs com carga superficial mais eletronegativa são as formadas pelo copoliéster PLGA, isso provavelmente está relacionado à exposição de grupos carboxílicos na sua superfície.

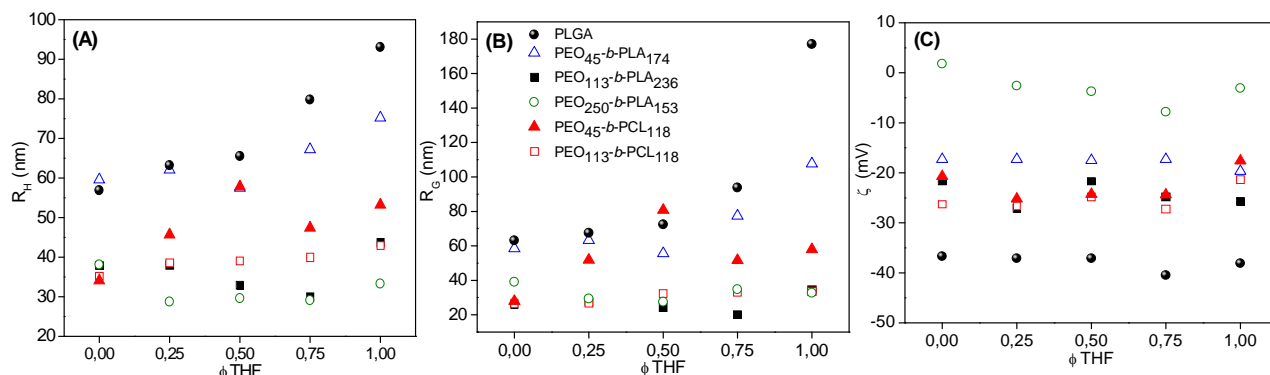


Figura I- Influência de ϕ_{THF} nos parâmetros estruturais (R_H , R_G , potencial- ζ) dos diferentes sistemas poliméricos nanoestruturados produzidos conforme a legenda mostrada em (B).

As análises de AFM realizadas dizem respeito à morfologia dos sistemas nanoestruturados produzidos.

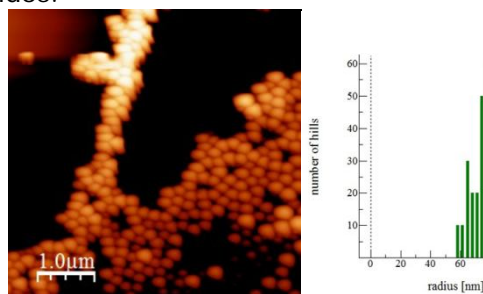


Figura II- Imagens obtidas por AFM para NPs de PLGA₂₁₉₁ produzidas a partir de THF e o respectivo histograma de distribuição de tamanho.

Como pode ser observado na imagem representativa de NPs de PLGA (Figura II), fica claro que se trata de objetos esféricos. Esta evidência foi observada para todos os outros sistemas investigados. Este resultado foi previamente sugerido pela combinação dos dados de SLS e DLS e da determinação do fator forma (ρ) dado pela razão entre R_G e R_H ($\rho = R_G/R_H$) que sempre esteve em torno de 1,0.

Ensaio de microscopia de fluorescência confocal representativos estão mostrados na Figura III. As imagens mostram que o perfil de internalização é ditado preferencialmente pelo tamanho da coroa hidrofílica de PEO, uma vez que a endocitose dos sistemas é mais pronunciada para NPs formadas por coroas hidrofílicas menores, como pode ser observado na figura III A, onde a fluorescência está relacionada a internalização NPs PEO₄₅-b-PCL₁₁₈, em comparação com a Figura III B que o mesmo processo para NPs de PEO₂₅₀-b-PLA₁₅₃. As NPs de PLGA₂₁₉₁ apresentam menor intermediária devido ao seu alto potencial- ζ , sendo assim inibida por repulsão eletrostática conforme mostrado na Figura III C.

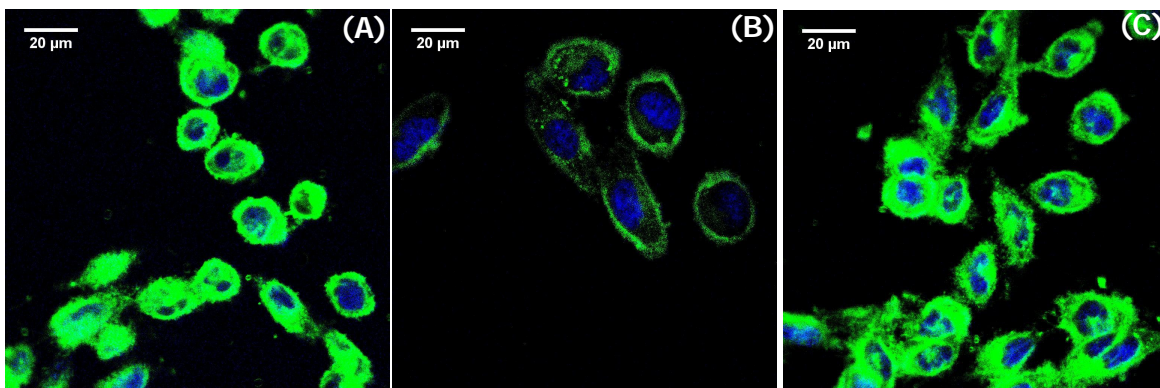


Figura III - Imagens de microscopia de fluorescência confocal para células de glioblastoma U251 incubadas com nanopartículas marcadas com coumarina-6. A internalização é maior para NPs formadas com coroas hidrofílicas menores como em (A) para PEO₄₅-*b*-PCL₁₁₈ (φ THF000), em relação a NPs que apresentam maior bloco hidrofílico, que desfavorecem a adesão por impedimento estérico como pode ser visto em (B) para NPs de PEO₂₅₀-*b*-PLA₁₅₃ (φ THF050). Já em (C) as NPs de PLGA₂₁₉₁ (φ THF100), embora apresente significativa captura celular, não apresentam intensidade de fluorescência superior a (A), devido a repulsão eletrostática promovida pelos seus grupos carboxílicos. Magnificação de 63X

CONCLUSÕES

Os dados experimentais de espalhamento de luz e imagem mostraram a eficiência na obtenção de nanopartículas esféricas com diferentes propriedades físico-químicas. A dimensão da coroa hidrofílica desempenha papel fundamental na captura celular dos nanocarreadores.

Agências de Fomento: CNPq (470608/2012-9) e FAPESP (2014/22983-9)

REFERÊNCIAS

- DE CASTRO C E, MATTEI B, RISKE K A, JÄGER E, JÄGER A, STEPÁNEK P, GIACOMELLI F C. **Understanding the Structural parameters of biocompatible Nanoparticles dictating protein fouling.** Langmuir,30: 9770–9779,2014.
- DE OLIVEIRA A M, JÄGER E, JÄGER A, STEPÁNEK P, GIACOMELLI F C. **Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward,** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,436:1092-1102,2013.
- LEE N, HYEON T. **Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents.** Chemical Society Reviews, 41: 2575-2589, 2012.
- MAEDA H, WU J, SAWA T, MATSUMURA Y, HORI K. **Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review.** Journal of Controlled Release. 65: 271-284,2000.
- ZHANG P, WANG T Y, XIONG H M, KONG J L. **In situ tracking the intracellular delivery of antisense oligonucleotides by fluorescein doped silica nanoparticles .** Talanta, 127: 43-50,2014.