

University of Groningen

Nanobiomaterials for biological barrier crossing and controlled drug delivery

Ribovski, Lais

DOI:
[10.33612/diss.124917990](https://doi.org/10.33612/diss.124917990)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Ribovski, L. (2020). *Nanobiomaterials for biological barrier crossing and controlled drug delivery*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.124917990>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDIX A:

Algemene discussie em
toekomstperspectieven

Discussão geral e perspectivas
futuras



ALGEMENE DISCUSSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Nanodeeltjes als dragers van therapeutische verbindingen en voedingsstoffen zijn veelbelovende platforms waarvan verschillende werkvelden in de geneeskunde kunnen profiteren, waaronder de behandeling en diagnose van diverse ziektebeelden zoals kanker en aandoeningen van het centrale zenuwstelsel. Desalniettemin is het essentieel om de cellulaire respons op die materialen van nanoformaat in preklinische fasen te evalueren om ze correct te kunnen vertalen naar klinische toepassingen. Veel publicaties missen echter belangrijke parallellen met *in vivo* omstandigheden en beschrijven en bespreken vaak niet de gebreken of mogelijke alternatieven om het nanosysteem beter te begrijpen en te verbeteren.

Hoewel de eigenschappen van nanomaterialen zoals grootte en oppervlaktelading uitgebreid zijn bestudeerd, worden veel andere eigenschappen minder benadrukt. Dit proefschrift bespreekt in Hoofdstuk 2 het effect van stijfheid van nanodeeltjes op hun interactie met gepolariseerde endotheelcellen, die de bloed-hersenbarrière (BHB) nabootsen. Als modeldeeltje gebruikten we poly(N-isopropylmethacrylamide) (p(NIPMAM)) nanogels, bereid door middel van precipitatiepolymerisatie, waarvan de stijfheid werd gereguleerd door de aanwezigheid van verschillende concentraties crosslinker, N,N'-methyleenbis(acrylamide). De resultaten laten zien dat hoewel hardere nanogels (NG14, 14 mol% BIS) hogere niveaus van opname door de gepolariseerde monolaag vertonen, de zachtere nanogels (NG1.5 en NG5, respectievelijk 1.5 en 5 mol% BIS) een hogere transcytose door de BHB laten zien. Er werd geen significante variatie gedetecteerd voor deeltjes met dezelfde crosslinkdichtheid en een tweevoudig verschil in grootte. Interessant is dat voor NG1.5 and NG5 de mate van zowel internalisatie als transcytose identiek waren, maar significant verschilden van de mate van internalisatie en transcytose van NG14, wat een scherpe respons op de stijfheid van het deeltje suggereert. Op basis van theoretische modellen(1,2) speculeren we dat de buiging van het celmembraan veroorzaakt door de zachtere nanogels laag is in vergelijking met de hardere nanogel, vanwege de verspreiding van zachte nanogels over het membraan en als gevolg daarvan verminderde druk op het membraan. De variatie in buiging van het membraan zal de kinetiek van het omsluiten van de nanogel en uiteindelijk de mate van opname door de cel beïnvloeden. Variaties in de vorming van de eiwitcorona tussen zachtere en stijvere nanogels kunnen ook bijdragen aan de waargenomen interactie van

deeltjes met de endotheelcellen. Het is opmerkelijk dat eiwithechting op nanogels laag is in vergelijking tot andere nanodeeltjes,(3) Het tegengestelde effect van nanogelstijfheid op hun opname en transcytose benadrukt het belang van vesiculaire traffickingmechanismen en exocytose bij het bepalen van de transcytose-efficiëntie, en onderstreept dat verbeterde internalisatie niet leidt tot verbeterde transcytose. Ditzelfde werd opgemerkt bij nanodeeltjes die werden voorzien van liganden met verschillende affiniteit voor een specifieke receptor: nanodeeltjes met hoge affiniteit liganden lieten hoge opname, maar lage transcytose zien,(4-6) wat een belangrijk inzicht opleverde in het mechanisme van transport over de BBB. Onze bevinding met niet-gefunctionaliseerde deeltjes met verschillende stijfheden suggereert het bestaan van stijfheidsafhankelijke niet-ligand-gemedieerde transcytose. Technieken die het gebruik van liganden kunnen vermijden kunnen gunstig zijn voor klinische vertaling, aangezien de werkzaamheid van liganden onderhevig is aan inter-patiënt en intra-patiënt variabiliteit.

Met de toepasbaarheid van met name zachte nanogels voor het passeren van de BHB, evalueerden we vervolgens de rol van nanogelstijfheid in hun interactie met gliomacellen en fagocyterende cellen, specifiek niet-gepolariseerde macrofagen (**Hoofdstuk 3**). De opname van zachtere nanogels was significant lager in zowel de gliomacellen als macrofagen in vergelijking met de opname van de stijvere nanogel, wat correleert met het waargenomen gedrag in de hersenendotheelcellen. In macrofagen werden de grotere nanogels aanzienlijk meer geïnternaliseerd dan de kleinere nanogels. Een dergelijke variatie kan worden toegeschreven aan het verbeterde contact tussen het celmembraan en de nanogels van grotere afmetingen. Omdat het celmembraan niet helemaal vlak is, maar vol met uitstulpingen, kunnen nanodeeltjes ook een interactie aangaan met die uitstulpingen. Deeltjes met een diameter groter dan de "vlakke" gebieden tussen de uitstulpingen zullen in staat zijn om meerdere additionele contactpunten met het membraan tot stand te brengen (d.w.z. met de uitstulpingen), terwijl deeltjes die kleiner zijn dan de vlakke gebieden ten hoogste aansluiten op het vlakke gebied en één uitstulping. De optimale deeltjesgrootte voor maximale fagocytose wordt bereikt wanneer de deeltjes zich kunnen verbinden met een vlak gebied en twee uitstulpingen. Onder en boven deze optimale grootte is de fagocytose van nanodeeltjes verminderd.(7) De lagere opname van zachtere nanogels is een belangrijke indicatie voor de ontsnapping van die deeltjes aan het mononucleaire fagocytische systeem (MPS), wat de halfwaardetijd

van de deeltjes in het bloed verhoogt. Gezien het feit dat zachte NG1.5- en NG5-nanogels de BHB efficiënter passeren dan harde NG14-nanogels, geloven we dat zachte nanogels veelbelovend zijn voor het targeten van medicijnen naar de hersenen.

Nanogel-stijfheid bleek ook een effect te hebben op de levensvatbaarheid van cellen. Gliomacellen vertoonden een omgekeerde relatie tussen de inductie van ROS en NG-stijfheid, d.w.z. de hoogste ROS-inductie door de zachtste NG. Dit is een zeer interessante respons, aangezien de productie van ROS een van de belangrijkste mechanismen is waarmee chemotherapeutica kankercellen doden. De ROS-niveaus die door de macrofagen werden vertoond waren hoger dan door de C6-cellen bij alle NGs, maar dankzij adaptieve mechanismen kunnen macrofagen de verhoogde stress overleven.(8,9) In een directe co-cultuur was het cytotoxische effect van de zachte NG (NG1.5) verminderd, en was het ROS-niveau van de gecombineerde celpopulaties aanzienlijk lager dan de som van de ROS-niveaus van de twee monoculturen. De directe co-cultuur beïnvloedde ook de mate van internalisatie van nanogels, en resulteerde in een verhoogde opname door de macrofagen. De veranderingen in toxiciteit en internalisatiegedrag kunnen worden toegeschreven aan veranderingen in de fenotypering en functie van de macrofagen zoals veroorzaakt door de gelijktijdige aanwezigheid van kankercellen. De fagocyterende capaciteit van macrofagen neemt toe wanneer ze worden gestimuleerd,(10-12) hier door tumor-afkomstige factoren die worden uitgescheiden door de gliomacellen. Ook activeert ROS de activiteit van ROS-scavengers die het opruimen van overmatige ROS bevorderen, wat zal leiden tot een vermindering van het toxische effect door NGs in de gliomacellen. De ROS-generatie door zachte (p(NIPMAM)) NGs in kankercellen kan worden benut in systemen voor medicijnafgifte om de afgifte van therapeutische verbindingen te reguleren.(13,14) Ook kunnen andere stimuli-afhankelijke triggers in het systeem worden opgenomen, zoals nanodeeltjes-gemedieerde hyperthermie om kankercellen te chemosensibiliseren, wat in het geval van de thermoresponsieve p(NIPMAM) NGs ook de medicijnafgifte kan bevorderen als gevolg van de collaps van de NGs.(15-17)

Bovendien ondersteunen de resultaten van **Hoofdstuk 2 en 3** de noodzaak om het potentieel van nanomaterialen te evalueren in omstandigheden die beter overeenkomen met *in vivo* omgevingen, rekening houdend met mogelijke biologische barrières zoals de bloed-hersenbarrière en de aanwezigheid van macrofagen.

In **Hoofdstuk 4** werd gebruik gemaakt van homotypische adhesie tussen borstkankercellen om een effectiever nanotherapeutisch systeem te realiseren.

Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) nanocarriers (NCs) werden bekleed met het membraan van MCF-7 borstkankercellen en hun interactie met MCF-7 borstkankercellen, niet-maligne borstcellen, en longkankercellen werd geanalyseerd. Een toename in interactie van met membraan beklede NCs ten opzichte van niet-beklede NCs werd aangetoond voor alle celtypes. De verbeterde adhesie tussen de membraan-beklede NCs en cellen houdt vermoedelijk verband met de aanwezigheid van gemeenschappelijke membraaneiwitten, b.v. epithelial cell adhesion molecule (EpCAM).(18-20)

Echter, op het moment dat de membraan-beklede NCs geladen werden met paclitaxel, een chemotherapeutisch middel, was er enkel een statistisch significante vermindering van de cellulaire levensvatbaarheid van MCF-7-cellen, d.w.z. de cellijn waarvan het membraan was afgeleid. Het bekleden van nanodeeltjes met van tumor afkomstig materiaal lijkt een effectieve manier om de effectiviteit en doelgerichtheid van nanotherapeutica op tumorcellen te verbeteren. Het biedt bovendien een eenvoudige manier om nanotherapeutica 'op maat' te ontwerpen, waarbij de identificatie en productie van specifieke liganden wordt vermeden. Tumorcelmembraanextractie kan worden overwogen als onderdeel van een gepersonaliseerde behandeling waarbij tumorcellen van de patiënt *ex vivo* kunnen worden vermenigvuldigd voorafgaand aan membraanextractie voor op maat gemaakte patiënt-specifieke nanotherapeutica, waarbij inefficiëntie met betrekking tot intra-patiënt heterogeniteit wordt vermeden. Rao et al (21) gebruikten deze strategie door nanodeeltjes te coaten met membraanmateriaal van tumorcellen van patiënten met plaveiselcelcarcinoom van hoofd en nek, en beschreven een superieur effect voor (post-chirurgische) behandelingen die getarget werden met behulp van een cellulaire coating afkomstig van de *in vivo* target. Bovendien kunnen cellen genetisch gemanipuleerd worden om specifieke moleculen aan het celoppervlak te produceren of gekoppeld aan extracellulaire blaasjes (exosomen), die gebruikt kunnen worden om nanodeeltjes te coaten die de micro-omgeving van de tumor targeten.

Tot slot rapporteert **Hoofdstuk 5** de ontwikkeling van licht-geïnduceerde afgifte uit liposomen door middel van fotochemische en thermische isomerisatie gemedieerd door synthetische moleculaire motoren. Besturing van door licht aangedreven moleculaire motoren toont ruimtelijke en temporele precisie. Door de moleculaire motoren in de lipide dubbellaag van liposomen op te nemen werd calceïne alleen vrijgegeven onder invloed van UV-straling en werd aangetoond dat langere

blootstellingstijden de calceïne-afgifte uit de liposomen verhoogden. Het verkrijgen van nauwkeurige controle over de afgifte van moleculen uit een medicijnafgiftesysteem is essentieel en de moleculaire motoren toonden een uitstekende regulering met een eenvoudige strategie. Deze resultaten ontsluiten mogelijkheden voor de toepassing van moleculaire motoren in de nanogeneeskunde en verdere ontwikkeling naar nauwkeurig gecontroleerde afgiftesystemen. Een waardevolle vooruitgang zou het gebruik van moleculaire motoren die reageren op langere golflengten zijn, waardoor weefsels beter binnengedrongen worden, of hun gebruik in polymerosomen, een veelzijdig systeem dankzij het gemak van polymeersynthese.(22) Afgiftesystemen die externe of interne signalen kunnen identificeren en daar nauwkeurig op reageren, strevend naar 'on-demand' afgifte kinetiek, zijn van groot belang voor de gecontroleerde afgifte van therapeutische verbindingen. Om deze systemen te kunnen creëren is beter begrip van de nanomateriaal-cel en -weefsel interactie echter noodzakelijk.

Dit proefschrift presenteert nieuwe afgiftesystemen op nanoschaal:nanogels, membraan-beklede PLGA-deeltjes en liposomen met moleculaire motoren, die allen werden ontworpen om de therapeutische werkzaamheid te verbeteren. De beschreven studies vergroten onze kennis over eigenschappen van nanodeeltjes, d.w.z. de stijfheid, grootte, en celaffiniteit, die de interacties met biologische systemen beïnvloeden.

Toekomstperspectieven

De studie van nanomateriaal-cel interactie in dit proefschrift heeft inzichten opgeleverd op het gebied van nanotechnologie toegepast op geneeskunde. We hebben aangetoond dat transport over de bloed-hersenbarrière en internalisatie van polymere nanogels kan worden gereguleerd door de stijfheid van deeltjes aan te passen. Als volgende stap zouden we geïnteresseerd zijn in het onderzoeken van de intracellulaire trafficking van nanogels en de impact ervan op de exocytose van de nanogels. Verder zijn *in vivo* experimenten nodig om te bevestigen of het effect van de stijfheid dat wordt waargenomen in het filtervrije bloed-hersenbarrièremodel overeenkomt met het *in vivo* gedrag van zachte NGs en of zachte NGs voordelig zouden zijn als medicijnafgiftesysteem naar de hersenen. Evenzo moet het effect van stijfheid van nanodeeltjes op de *in vivo* afgifte van geneesmiddelen aan glioblastoma

worden geëvalueerd en worden vergeleken met de resultaten van de *in vitro* co-cultuur van gliomacellen en perifere macrofagen, die beide deel uitmaken van de tumor-micro-omgeving (TMO), om de voorspellende waarde van het co-cultuursysteem te beoordelen. Het verkennen van het gedrag van nanodeeltes in 3D-co-cultuursystemen zal tevens rekening houden met de mogelijke invloed van de extracellulaire matrix en weefselstructuur. Het zou interessant zijn om, gebruikmakend van tumorcellen van patiënten, membraan-beklede nanocarriers te produceren en hun interactie met primaire tumoren en circulerende tumorcellen (CTC's) te analyseren. Ten slotte is het bestuderen van de on-demand medicijnafgifte uit moleculaire motor-bevattende liposomen in cellen essentieel om de mate van controle over medicijnafgifte en te bepalen alsmede de veiligheid in reactie op de belichting van cellen met verschillende lichtbronnen. De technologie zou ook vertaald moeten worden naar andere dragersystemen, b.v. polymerosomen en polymere nanodeeltjes, en worden onderzocht voor toepassing in gebieden als fotodynamische therapie.

REFERENTIES

1. Yi X, Gao H. Cell membrane wrapping of a spherical thin elastic shell. *Soft Matter*. 2015;11(6):1107–15.
2. Shen Z, Ye H, Yi X, Li Y. Membrane Wrapping Efficiency of Elastic Nanoparticles during Endocytosis: Size and Shape Matter. *ACS Nano*. 2019;13(1):215–28.
3. Miceli E, Kuroпка B, Rosenauer C, Osorio Blanco ER, Theune LE, Kar M, et al. Understanding the elusive protein corona of thermoresponsive nanogels. *Nanomedicine*. 2018;13(20):2657–68.
4. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, et al. Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target. *Sci Transl Med*. 2011;3(84):84ra44 LP-84ra44.
5. Clark AJ, Davis ME. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(40):12486 LP-12491.
6. Villaseñor R, Schilling M, Sundaresan J, Lutz Y, Collin L. Sorting Tubules Regulate Blood-Brain Barrier Transcytosis. *Cell Rep*. 2017;21(11):3256–70.

7. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res.* 2008;25(8):1815–21.
8. Essler S, Dehne N, Brüne B. Role of sestrin2 in peroxide signaling in macrophages. *FEBS Lett.* 2009;583(21):3531–5.
9. Bauer M, Goldstein M, Christmann M, Becker H, Heylmann D, Kaina B. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(52):21105 LP-21110.
10. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc.* 2012;134(4):2139–47.
11. Qie Y, Yuan H, von Roemeling CA, Chen Y, Liu X, Shih KD, et al. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci Rep.* 2016;6(1):26269.
12. Binnemars-Postma KA, ten Hoopen HWM, Storm G, Prakash J. Differential uptake of nanoparticles by human M1 and M2 polarized macrophages: protein corona as a critical determinant. *Nanomedicine.* 2016;11(22):2889–902.
13. Liang J, Liu B. ROS-responsive drug delivery systems. *Bioeng Transl Med.* 2016;1(3):239–51.
14. Tao W, He Z. ROS-responsive drug delivery systems for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci.* 2018;13(2):101–12.
15. Huff TB, Tong L, Zhao Y, Hansen MN, Cheng J-X, Wei A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Feb;2(1):125–32.
16. Chatterjee DK, Diagaradjane P, Krishnan S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther Deliv.* 2011;2(8):1001–14.
17. Cazares-Cortes E, Nerantzaki M, Fresnais J, Wilhelm C, Griffete N, Ménager C. Magnetic Nanoparticles Create Hot Spots in Polymer Matrix for Controlled Drug Release. *Nanomater (Basel, Switzerland).* 2018;8(10):850.
18. Sarin R, Somsekhar SP, Kumar R, Pawan G, Sumeet J, Pramoj J, et al. Practical consensus recommendations for tumor margins and breast conservative surgery. *South Asian J cancer.* 2018;7(2):72–8.
19. van Lanschot CGF, Mast H, Hardillo JA, Monserez D, ten Hove I, Barroso EM, et al. Relocation of inadequate resection margins in the wound bed during oral cavity oncological surgery: A feasibility study. *Head Neck.* 2019;41(7):2159–66.

20. Nowikiewicz T, Śrutek E, Głowacka-Mrotek I, Tarkowska M, Żyromska A, Zegarski W. Clinical outcomes of an intraoperative surgical margin assessment using the fresh frozen section method in patients with invasive breast cancer undergoing breast-conserving surgery – a single center analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):13441.
21. Rao L, Yu G-T, Meng Q-F, Bu L-L, Tian R, Lin L-S, et al. Cancer Cell Membrane-Coated Nanoparticles for Personalized Therapy in Patient-Derived Xenograft Models. *Adv Funct Mater.* 2019;29(51):1905671.
22. Rideau E, Dimova R, Schwille P, Wurm FR, Landfester K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem Soc Rev.* 2018;47(23):8572–610.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de nanopartículas como carreadores de compostos terapêuticos e nutrientes é uma plataforma da qual diversas áreas da medicina se beneficiam, incluindo tratamento e diagnósticos de diversas patologias como câncer e patologias do sistema nervoso central. Ainda assim, é essencial avaliar a resposta celular na presença de materiais nanométricos em fases pré-clínicas para que a tecnologia seja apropriadamente transferida a aplicações clínicas. Contudo, muitos trabalhos ainda carecem importantes paralelos às condições *in vivo* e frequentemente não descrevem e discutem as desvantagens ou possíveis alternativas para melhor entender e melhorar o sistema nanométrico.

Enquanto propriedades de nanomateriais como tamanho e carga de superfície têm sido extensivamente estudadas, muitas outras propriedades são menos exploradas. Esta tese discute o papel da rigidez de nanomateriais na interação com células endoteliais polarizadas simulando a barreira hematoencefálica no Capítulo 2. Como partícula modelo foram utilizados poli(N-isopropilmetacrilamida) (p(NIPMAM)) nanogéis sintetizados por polimerização por precipitação sendo que a rigidez dos nanogéis foi modificada de acordo com a presença de diferentes densidade do agente de intercalação N,N'-metilenobis(acrilamida) (BIS). Os resultados revelam que embora os nanogéis mais rígidos (NG14, 14 mol% BIS) apresente maior internalização pelas monocamada de células polarizadas, os nanogéis de menor rigidez (NG1.5 e NG5, respectivamente 1.5 e 5 mol% BIS) são favorecidos na transcitose através da barreira hematoencefálica. Nenhuma diferença significativa foi observada para partículas com mesma densidade de intercalação e tamanhos diferindo em duas vezes. Curiosamente, os níveis de internalização bem como os de transcitose foram indistinguíveis para NG1.5 e NG5, mas significativamente diferentes da internalização e transcitose de NG14, sugerindo uma resposta expressiva em relação à rigidez da partícula. Com base em modelos teóricos,^(1,2) especula-se que a deformação da membrana celular induzida pelos nanogéis de menor rigidez é pequena quando comparada aos de maior rigidez devido ao espalhamento daqueles nanogéis sobre a membrana e, conseqüentemente, uma pressão reduzida é aplicada à membrana. A variação da amplitude de deformação afeta a cinética de envelopamento dos nanogéis e, conseqüentemente, os níveis de internalização. As diferenças na formação de corona de proteínas entre nanogéis menos e mais rígidos também pode contribuir

para a interação observada com a monocamada de células. Deve-se notar que a adesão de proteínas aos nanogéis é baixa se comparada a outras nanopartículas.(3) O efeito antagônico da rigidez dos nanogéis na sua capacidade de internalização e transcitose destaca a importância dos mecanismos de tráfico vesicular e exocitose na eficiência de transcitose, enfatizando que uma internalização superior não implica em uma melhor transcitose. Tal efeito também foi observado quando se compara o uso de ligantes de alta e baixa afinidade na funcionalização de nanopartículas para a transcitose mediada por receptores,(4-6) o que trouxe um insight ao transporte através da barreira hematoencefálica. Os resultados com partículas não funcionalizadas e de diferentes durezas sugere a existência de transcitose dependente de rigidez e não mediada por ligante. Técnicas que evitam o uso de ligantes podem ser benéficas para o uso clínico já que a eficácia dos ligantes está sujeita à heterogeneidade inter-paciente e intra-paciente.

Devido a aplicabilidade de nanogéis - especialmente os menos rígidos – para atravessar a barreira hematoencefálica, também avaliamos o efeito da rigidez dos nanogéis na interação com células de glioma e células fagocíticas, em especial macrófagos não-polarizados (Capítulo 3). A internalização de nanogéis menos rígidos foi significativamente menor nas células de câncer e nas fagocíticas comparada à internalização de nanogéis mais rígidos, o que se correlaciona com o comportamento observado em células endoteliais cerebrais. Em macrófagos, os nanogéis de maior tamanho foram mais internalizados que os menores. Tal variação pode ser atribuída ao maior contato entre membrana celular e nanogéis maiores. Porque a membrana celular não é completamente lisa mas repleta de irregularidades, nanopartículas também podem interagir com estas irregularidades. Partículas com diâmetro maior que a região lisa entre as irregularidades estabelecerão pontos adicionais de contato com a membrana (i.e., com as rugosidades), enquanto partículas menores que a região lisa se conectarão no máximo com a região lisa e com uma rugosidade. O tamanho ótimo da partícula para máxima fagocitose será quando a partícula é capaz de conectar com a região lisa e duas rugosidades. Abaixo ou acima desse tamanho a fagocitose das nanopartículas será reduzida.(7) A internalização reduzida dos nanogéis menos rígidos é uma importante indicação da evasão destas partículas do sistema mononuclear fagocitário, aumentando o tempo de meia-vida das partículas. Considerando que os nanogéis NG1.5 and NG5 de menor rigidez atravessam a

barreira hematoencefálica mais eficientemente que o NG14 mais rígido, acredita-se que os nanogéis de menor rigidez são promissores para terapias dirigidas ao cérebro.

A rigidez dos nanogéis teve efeito na viabilidade celular. As células de glioma mostraram uma relação inversa entre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e rigidez dos nanogéis, i.e., houve maior indução de ROS pelos nanogéis menos rígidos. Esta é uma resposta bastante interessante, considerando que a produção de ROS é um dos principais mecanismos pelo qual quimioterápicos matam células de câncer. Os níveis de ROS exibidos pelos macrófagos foram mais elevados que os exibidos pelas células C6 de glioma para todos os nanogéis, entretanto mecanismos de adaptação permitem que os macrófagos sobrevivam ao estresse elevado.(8,9) Em co-cultura direta, o efeito citotóxico do nanogel de menor rigidez (NG1.5) foi menor e o nível de ROS das populações celulares combinadas foi consideravelmente menor que os níveis combinados das monoculturas. A co-cultura direta também influenciou a internalização dos nanogéis, levando a uma maior internalização pelos nanogéis. As mudanças em toxicidade e internalização podem ser atribuídas a mudanças em fenótipo e função dos macrófagos induzidas pela presença das células de câncer. A capacidade fagocítica de macrófagos é aumentada quando estes são estimulados,(10–12) o que ocorre na presença de fatores secretados por células de glioma. Ainda, ROS desencadeada a atividade de “ROS-scavengers” promovendo a captura do ROS em excesso, reduzindo o efeito dos nanogéis nas células de glioma. A produção de ROS pelos (p(NIPMAM)) nanogéis de menor rigidez em células de câncer pode ser explorada em sistemas de entrega de fármacos para controlar a liberação de compostos terapêuticos.(13,14) Adicionalmente, outros gatilhos podem ser incorporados ao sistema como hipertermia mediada por nanopartículas para quimiossensibilizar células de câncer, o que no caso dos p(NIPMAM) termorreversíveis nanogéis também pode promover liberação devido ao colapso dos nanogéis.(15–17)

Ainda, resultados do **Capítulo 2** e **3** suportam a necessidade de avaliar o potencial de nanomateriais em condições mais condizentes com as configurações in vivo, considerando possíveis barreiras biológicas, e.g. barreira hematoencefálica e células fagocíticas.

No **Capítulo 4**, a adesão homotípica entre células de câncer foi explorada para obter um sistema nanoterapêutico mais efetivo. Nanocarreadores (NCs) de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) foram recobertos com membrana de células MCF-7

de câncer de mama e sua interação com células MCF-7 de câncer de mama, célula não-tumorigênicas de mama, e células de câncer de pulmão foi analisada e mostrou-se um aumento na interação entre NCs recobertos com membrana e todos os tipos celulares quando comparado aos NCs não recobertos. O aumento da adesão celular para todos os tipos celulares se relaciona à presença em comum de proteínas de membrana e.g. molécula de adesão celular epitelial (EpCAM, do inglês *epithelial cell adhesion molecule*). (18–20)

Contudo, quando os NCs recobertos com membrana são carregados com paclitaxel, um quimioterápico, houve uma redução estatisticamente significativa em viabilidade celular apenas para células MCF-7, i.e., a linhagem celular da qual as membranas se derivam. A construção de nanopartículas com material derivado de tumores parece ser uma forma efetiva de melhorar a eficácia e seletividade de nanoterapêuticos. Ainda, é um processo menos árduo para o design personalizado de nanoterapêuticos, evitando a identificação e produção de ligantes específicos. A extração de membrana celular tumoral pode ser vista como parte de um tratamento personalizado onde células tumorais do paciente podem ser proliferadas *ex vivo* para posteriormente extrair membrana para um nanoterapêutico personalizado para o paciente, enquanto evita ineficácia devido a heterogeneidade intra-paciente. Rao et al. (21) já contribuíram com resultados nessa direção empregando membrana de células derivadas de tumores de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço para recobrir nanopartículas e descrevem um efeito superior para o tratamento e o tratamento pós-operatório que utilizaram as nanopartículas recobertas com membrana da mesma célula que se originou o modelo produzido *in vivo*. Além disso, células também podem ser geneticamente modificadas para produzir moléculas específicas na superfície celular ou associadas a vesículas extracelulares que podem ser utilizadas para recobrir as nanopartículas para atingir o microambiente do tumor.

Para concluir, o **Capítulo 5** reporta o desenvolvimento de liberação induzida por luz em lipossomos por meio de isomerização fotoquímica e térmica mediada por motores moleculares sintéticos. O controle de motores moleculares ativados por luz mostra precisão espacial e temporal. Incorporando os motores moleculares na bicamada lipídica de lipossomos, calceína foi liberada apenas quando o sistema foi exposto à radiação UV e tempos de exposição mais longos levaram a um aumento da liberação de calceína dos lipossomos. Tendo controle preciso sobre a liberação de

moléculas de sistemas de entrega de fármacos é essencial e motores moleculares mostraram uma regulação excepcional com uma estratégia simples. Estes resultados abrem possibilidades para a aplicação de motores moleculares em nanomedicina e avanços para sistemas precisos de liberação controlada. Avanços valiosos seriam o uso de motores moleculares que respondam a comprimentos de onda mais longos, permitindo melhor penetração nos tecidos, ou o uso de polimerossomos, um sistema versátil devido a facilidade da síntese de polímeros.(22) Sistemas de entrega capazes de identificar e precisamente responder a estímulos externos e internos visando uma cinética de liberação “*on demand*” são de grande interesse para a entrega de compostos terapêuticos. Contudo, para ser capaz de criar esses sistemas, uma compreensão profunda da interação nanomaterial-célula e nanomaterial-tecido é necessária.

Esta tese apresenta sistemas de entrega inovadores, especificamente nanogéis, partículas de PLGA recobertas com membrana, e lipossomos contendo motores moleculares, que foram planejadas para melhorar a eficácia terapêutica. Os estudos descritos expandem nosso conhecimento sobre propriedades de nanopartículas, em específico, rigidez, tamanho, e afinidade celular, que afetam as interações de nanopartículas com sistemas biológicos.

Perspectivas futuras

O estudo da interação nanomateriais-célula nesta tese fornece insights para a área de nanotecnologia aplicada à medicina. Demonstrou-se que o transporte através da barreira hematoencefálica e internalização de nanogéis poliméricos pode ser regulada ajustando a rigidez da partícula. Como próximo passo, seria interessante investigar o tráfico intracelular vesicular dos nanogéis e seu impacto na exocitose. Além disso, experimentos *in vivo* são necessários para confirmar se o efeito observado devido à rigidez no modelo sem filtro de barreira hematoencefálica se repete para os nanogéis de menor rigidez, e se estas nanopartículas seriam vantajosas como um sistema de entrega de fármacos para o cérebro. Da mesma forma, o efeito da rigidez de nanopartículas na entrega de fármacos *in vivo* para glioblastoma deve ser avaliada, e comparada com os resultados obtidos em co-cultura *in vitro* de células de glioma e macrófagos periféricos mimetizando o microambiente do tumor a fim de avaliar o valor preditivo do sistema de co-cultura. Além disso,

explorar o comportamento das nanopartículas em sistema 3D de co-cultura incluiria a influência da matriz extracelular e estrutura de tecido. Seria de nosso interesse preparar nanocarreadores recobertos com membrana celular de células derivadas de tumores de pacientes, e analisar a interação desses carreadores com tumores primários e células tumorais circulantes. Finalmente, estudar a liberação “*on demand*” dos lipossomos contendo motores moleculares em células é essencial para determinar o nível de controle sobre a entrega de fármacos bem como estabelecer uma resposta segura à iluminação das células com diferentes fontes de luz. A tecnologia também deve ser transferida a outros sistemas de carreamento, e.g. polimerossomos e nanopartículas poliméricas, e ser explorada em áreas como terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

1. Yi X, Gao H. Cell membrane wrapping of a spherical thin elastic shell. *Soft Matter*. 2015;11(6):1107–15.
2. Shen Z, Ye H, Yi X, Li Y. Membrane Wrapping Efficiency of Elastic Nanoparticles during Endocytosis: Size and Shape Matter. *ACS Nano*. 2019;13(1):215–28.
3. Miceli E, Kuropka B, Rosenauer C, Osorio Blanco ER, Theune LE, Kar M, et al. Understanding the elusive protein corona of thermoresponsive nanogels. *Nanomedicine*. 2018;13(20):2657–68.
4. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, et al. Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target. *Sci Transl Med*. 2011;3(84):84ra44 LP-84ra44.
5. Clark AJ, Davis ME. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(40):12486 LP-12491.
6. Villaseñor R, Schilling M, Sundaresan J, Lutz Y, Collin L. Sorting Tubules Regulate Blood-Brain Barrier Transcytosis. *Cell Rep*. 2017;21(11):3256–70.
7. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res*. 2008;25(8):1815–21.
8. Essler S, Dehne N, Brüne B. Role of sestrin2 in peroxide signaling in macrophages. *FEBS Lett*. 2009;583(21):3531–5.

9. Bauer M, Goldstein M, Christmann M, Becker H, Heylmann D, Kaina B. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(52):21105 LP-21110.
10. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc.* 2012;134(4):2139–47.
11. Qie Y, Yuan H, von Roemeling CA, Chen Y, Liu X, Shih KD, et al. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci Rep.* 2016;6(1):26269.
12. Binnemars-Postma KA, ten Hoopen HWM, Storm G, Prakash J. Differential uptake of nanoparticles by human M1 and M2 polarized macrophages: protein corona as a critical determinant. *Nanomedicine.* 2016;11(22):2889–902.
13. Liang J, Liu B. ROS-responsive drug delivery systems. *Bioeng Transl Med.* 2016;1(3):239–51.
14. Tao W, He Z. ROS-responsive drug delivery systems for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci.* 2018;13(2):101–12.
15. Huff TB, Tong L, Zhao Y, Hansen MN, Cheng J-X, Wei A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Feb;2(1):125–32.
16. Chatterjee DK, Diagaradjane P, Krishnan S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther Deliv.* 2011;2(8):1001–14.
17. Cazares-Cortes E, Nerantzaki M, Fresnais J, Wilhelm C, Griffete N, Ménager C. Magnetic Nanoparticles Create Hot Spots in Polymer Matrix for Controlled Drug Release. *Nanomater (Basel, Switzerland).* 2018;8(10):850.
18. Sarin R, Somsekhar SP, Kumar R, Pawan G, Sumeet J, Pramoj J, et al. Practical consensus recommendations for tumor margins and breast conservative surgery. *South Asian J cancer.* 2018;7(2):72–8.
19. van Lanschoot CGF, Mast H, Hardillo JA, Monserez D, ten Hove I, Barroso EM, et al. Relocation of inadequate resection margins in the wound bed during oral cavity oncological surgery: A feasibility study. *Head Neck.* 2019;41(7):2159–66.
20. Nowikiewicz T, Śrutek E, Głowacka-Mrotek I, Tarkowska M, Żyromska A, Zegarski W. Clinical outcomes of an intraoperative surgical margin assessment using the fresh frozen section method in patients with invasive breast cancer undergoing breast-conserving surgery – a single center analysis. *Sci Rep.*

- 2019;9(1):13441.
21. Rao L, Yu G-T, Meng Q-F, Bu L-L, Tian R, Lin L-S, et al. Cancer Cell Membrane-Coated Nanoparticles for Personalized Therapy in Patient-Derived Xenograft Models. *Adv Funct Mater.* 2019;29(51):1905671.
 22. Rideau E, Dimova R, Schwille P, Wurm FR, Landfester K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem Soc Rev.* 2018;47(23):8572–610.

ACKNOWLEDGEMENTS



Waldemar Holten
07-11-12

ACKNOWLEDGEMENTS

To my parents, Vivian and Edilberto, I would like to thank you for your continuous support. You are always a safe house and it allows me to go for bigger challenges.

To my amazing sister Marina, for simply being who you are and always making me proud of being your sister.

To my grandparents, for all your love and wisdom, specially, to my lovely grandmother Izabel for always be an inspiration and amazing role model. I am very lucky to have such a modern and independent grandma.

I would like to thank Cecilia, Ewout, Tobias and Casper for being my family in the Netherlands and always welcome me in their house. Cecilia, you and Ives always worried about my education and I cannot thank you enough.

To my godparents, Ives and Eulália, who worried about me and always have a kind word to say.

To my dearest boyfriend who always takes such good care of me even when I forget to do myself. Your patience and kindness always comfort me.

I would like to thank all my supervisors who contribute to every word in this thesis. Inge, you constantly impress me and I learn a lot from every scientific discussion we had. I would like to thank you and Patrick for always motivating me. You were a great combination as supervisors.

I also would like to thank Zucolotto and Juliana for all the thrust and freedom you gave through those many years.

Paula, your friendship and support through those years made everything more delightful. You were always a great company for a cup of coffee at the lab or dinner at Louie's. Also, for all the remote help with the endless bureaucratic issues and for giving me the motivation to finish writing the thesis.

To Gwenda, thank you for the endless patience with our never-ending flow cytometry experiments. It was great to always have someone to discuss the results. Also thank you for translating the Algemene Discussie En Toekomstperspectieven to Dutch, I promise I will try to learn Dutch better.

A warm thank to Cris and Olavo for always being such great colleagues and friends inside and outside the lab. Cris, it is always so nice to receive your messages telling me the news and asking how I am.

To all colleagues at the Biomedical Engineering Department, it was a pleasure knowing you all. Special thank you to Mari for answering all my questions about the defence procedures.

To all the members of the Nanomedicine and Nanotoxicology Group (GNano), especially Bruna, Romeu e Simone for all your support.

To all Zuhorn's group members for been such nice and friendly colleagues. I would like to thank Edwin for all the very useful insights about the BBB model and for always being so helpful.

To the members of Patrick's group also for being great colleagues. Torben, you were a great company at the ESB conference. Liang, I will always remember you telling me "you are a hard worker" when you were working as much as me. Also, a special thank you to our microgel team Guangyue, Damla, Olga and Clio.

To Raissa, I could not thank you enough for your friendship and way of always make things better with your sweetness.

To Luana, Aline, Mirjam, Maíra and many other students that even briefly I could collaborate to your projects and learn a lot with you.

I am grateful to the University of São Paulo for all the high-quality education I received through the years and all the infra-structure provided to develop my research. I also

thank all the staff for the technical and bureaucratic support. Silvio and Ricardo for always handling the endless administrative paperwork.

To Maria Neusa and all library support team, your help and patience made the whole correction and approval processes more enjoyable. Thank you.

I thank the University of Groningen for providing a great environment for research and a nice ensemble of interesting courses for the development of my carrier as a researcher, especially the Faculty of Medical Sciences, University Medical Center Groningen. Also, I am very grateful to the staff of the Biomedical Engineering Department for being always so helpful and professional creating a nice work environment.

I thank Reinier for trying to keep the cell culture organized, but mainly for was always be very helpful and willing to discuss protocols and experimental troubleshooting.

I would to thank all the professors that teach me so much about science and inspired me with your passion. Special thanks to professors Alessandro Nascimento and Franscisco Alcaraz for accepting me as assistant student during your courses. I learned a lot watching you teach and manage students.

I also would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financing my PhD scholarship in Brazil. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

I would like to thank the The Abel Tasman Talent Program of the Graduate School of Medical Sciences of the University of Groningen for the funding during my years in Groningen.

To the de Cock-Hadders Stichting, thank for the grant that support part of my PhD research in Groningen.

Inspired by Olavo Amorin, I should leave my gratitude to all the cells that honourably sacrificed their lives for this higher cause and apologize for those ones that died in vain from my mistakes. I will never forget each one of you.