POTENCIAL ANTITROMBOGÊNICO DE FILMES NANOESTRUTURADOS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E QUITOSANA COM ADIÇÃO DE HEPARINA, VIA LAYER-BY-LAYER, PARA CAPTURA DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Palavras-Chave: ***LAYER-BY-LAYER*, CAPTURA DE CTCs, POTENCIAL ANTITROMBOGÊNICO**

Autores(as):

JÚLIA LUIZ AFFONSO, FEQ – UNICAMP

Prof(ª). Dr(ª). MARISA MASUMI BEPPU (orientadora), FEQ – UNICAMP

EDUARDA BAGGIO PAGLIA (coorientadora), FEQ – UNICAMP

GABRIELA PEREIRA DE FREITAS, FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Células tumorais circulantes (CTCs) correspondem àquelas que originaram-se em um tumor e estão disseminadas na corrente sanguínea, contribuindo significativamente para o processo de metástase. A detecção e análise destas células viabilizam a identificação da doença e, uma vez que as CTCs podem espalhar-se ainda no início do tumor, é de extrema relevância ao prognóstico que as células cancerígenas sejam constatadas o mais cedo possível. Neste cenário, biomarcadores de CTCs têm sido amplamente estudados e desenvolvidos na área de nanotecnologia, visando o aprimoramento de métodos de detecção e isolamento destas células [1,2]. Ademais, é de suma importância que as tecnologias neste âmbito sejam altamente seletivas, para que selecionem apenas as células cancerosas e inibam as células sanguíneas comuns [3]. Assim, a técnica de Layer-by-Layer (LbL), bastante utilizada no Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP), emerge como um método que permite a produção de biomateriais nanoestruturados para aplicações biomédicas devido a sua versatilidade em automontagem [4].

A técnica de LbL consiste na montagem de camadas de polieletrólitos por meio da imersão alternada e em sequência de um substrato em soluções de cargas opostas. Esta abordagem permite a formação de multicamadas interpenetradas, a fim de formar filmes nanoestruturados com propriedades variáveis [5]. A escolha dos polieletrólitos utilizados afeta intrinsecamente as características do filme, portanto é preferível o uso de biopolímeros em razão das propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxidade desses materiais [6,7,8]. Estes aspectos são desejados para materiais

com aplicações em contato direto ao sangue [9]. Os biopolímeros escolhidos para a produção de recobrimentos e estudo deste projeto foram o ácido hialurônico (HA) e a quitosana (CHI).

O HA se sobressai por ser um co-regulador do comportamento celular, em especial, no processo tumoral [10]. Além disso, é um importante ligante do receptor CD44, o qual é altamente expressivo em células tumorais e se destaca por seu eficiente desempenho em técnicas de biorreconhecimento devido, em especial, a sua função de adesão celular [9,11]. A CHI, por sua vez, é interessante para a técnica devido ao seu caráter catiônico em soluções ácidas, admitindo interações com cargas negativas e neutras [12]. Todavia, um desafio importante o uso de polímeros em meio sanguíneo é evitar o comprometimento do biomaterial devido a hemocompatibilidade. O acúmulo por adsorção a superfície do dispositivo por plaquetas (e proteínas em geral encontradas no plasma) pode ocasionar a formação de coágulos, que por sua vez formam trombos. Este processo é conhecido como bioincrustação [4,9]. Desta forma, o uso de heparina tem sido extensivamente investigado a fim de evitar os empecilhos citados.

A heparina é um polissacarídeo de caráter anticoagulante por sua semelhança ao sulfato de heparano. Mi (2018) demonstrou que a incorporação de heparina em superfícies altamente adesivas a plaquetas resultou em uma redução significativa dessa adesão [13,14]. Assim, infere-se que a adição de heparina aos filmes de CHI/HA possa repelir biomoléculas sanguíneas indesejadas, favorecendo a adesão seletiva de CTCs.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo produzir, via LbL, filmes a base de HA e CHI para investigar a incorporação de heparina, por apresentar propriedades antitrombogênicas, a fim de obter-se biomateriais para biossensoriamento de CTCs.

METODOLOGIA:

A metodologia adotada para o estudo e produção dos biofilmes iniciou-se com a preparação das soluções de polietilenoimina (PEI), quitosana (CHI), ácido hialurônico (HA) e heparina, todas na concentração de 1 g/L, por solubilização em água Milli-Q e ajuste de pH para aproximadamente 4,0. Quanto aos substratos, lâminas de vidro foram submetidas a etapas sucessivas de limpeza, seguidas por tratamento com plasma.

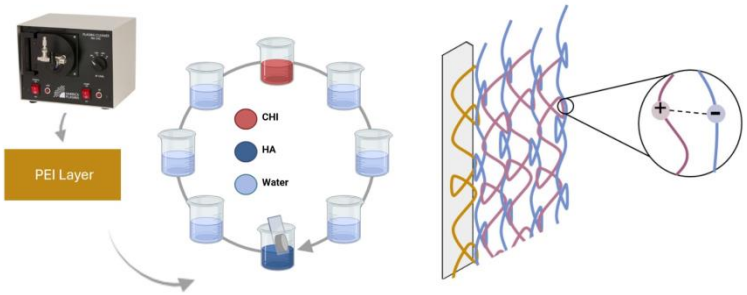

Figura 1 Etapas da metodologia layer-by-layer e representação dos recobrimentos ilustrados. Fonte: E.B. Paglia (coautora)

A aplicação de camadas aos recobrimentos foi realizada no equipamento Opentrons OT-2 com a técnica LbL. A princípio, os substratos foram imersos em PEI e, em seguida, alternadamente em soluções de CHI e HA para depositar 3,5, 5,5 e 8,5 bicamadas de policátion/poliânion em três diferentes lâminas. Variado número de bicamadas foi investigado a fim de analisar a ação dos biopolímeros quanto a espessura do filme. Cada imersão durou 15 minutos e entre cada uma foram realizadas três

lavagens em água Milli-Q por 2, 1 e 1 minutos. Assim, foram formados filmes nomeados de CHI/HA. O mesmo processo foi executado para filmes CHI/HA-hep, com o adicional final da monocamada de heparina solubilizada por 15 minutos, seguido das mesmas três lavagens em água Milli-Q.

A caracterização topográfica dos recobrimentos foi realizada pela técnica de Microscopia de Força Atômica, (AFM FlexAxiom SLD, Nanosurf, Suíça) no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da UNICAMP. A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o software Gwyddion. A caracterização dos filmes quanto a sua molhabilidade foi feita por medidas de ângulo de contato nos substratos com a utilização de água. Essas foram conduzidas com gotas de água ultrapura (3 µL, pH ~7.1 a 25 ºC) em quintuplicata. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), no Medidor de Ângulo de Contato DataPhysicsInstruments. modelo OCA 15.

Para os testes biológicos dos recobrimentos foram utilizadas células tumorais epiteliais prostáticas (PC3), obtidas da BCRJ em colaboração com o Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho (IB-UNICAMP). As células foram cultivadas em meio HAM F12 com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, a 37 °C e 5% de CO_2. A contagem celular foi realizada com Azul de Tripan e câmara de Neubauer.

Para o ensaio de adesão, 200 µL de suspensão celular (~6,25×10⁴ células) foram aplicados sobre os filmes em placas de poços e incubados por 1 h. Após lavagem com PBS para remoção das células não aderidas, as células fixadas com paraformaldeído (4%) foram coradas com Faloidina-TRITC (1:500) e DAPI (1:1000). A análise foi feita no microscópio Axio OBSERVER.z1 ZEISS (lente 20×/0.4), com captura de quatro imagens por filme (49 tiles cada).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os filmes com 3,5, 5,5 e 8,5 bicamadas tanto na composição de controle (sem heparina) CHI/HA, quanto na CHI/HA-hep (contendo heparina), foram analisados em microscopia de força atômica (AFM) e representados via software Gwyddion (Figura 1).

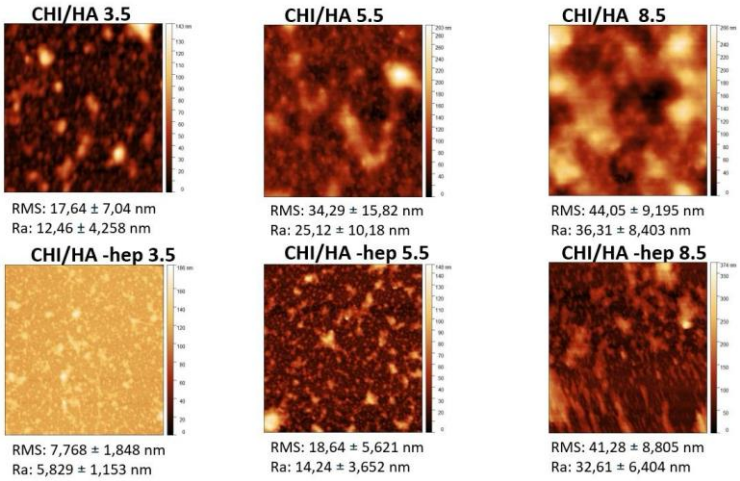

Figura 2 Microscopia de força atômica (AFM) dos filmes CHI/HA e CHI/HA-hep, em diferentes números de bicamadas

Os dados revelam uma direta relação entre o número de bicamadas e a rugosidade superficial dos filmes: o aumento do número de bicamadas é acompanhado de um aumento progressivo na rugosidade média (RMS) em ambos os tipos de filmes. Observa-se que, nos filmes mais finos (menor número de bicamadas), a presença de heparina reduz a rugosidade de forma mais evidente. Já nos filmes

mais espessos, o impacto da heparina na topografia é atenuado, possivelmente devido à contribuição das camadas subjacentes de CHI/HA. Esse efeito pode ser explicado pela capacidade da heparina de se acomodar melhor em superfícies menos rugosas, devido ao seu menor tamanho molecular.

Os ângulos de contato dos filmes CHI/HA foram de 9,60 ± 3,03° para 3,5 bicamadas, 14,15 ± 1,98° para 5,5 bicamadas e 18,55 ± 1,84° para 8,5 bicamadas, indicando que a hidrofilicidade diminui com o aumento da espessura do filme. Já os filmes contendo heparina (CHI/HA-hep) apresentaram ângulos de contato de 10,60 ± 2,03° (3,5 bicamadas), 11,00 ± 0,08° (5,5 bicamadas) e 8,00 ± 0,96° (8,5 bicamadas), valores relativamente baixos e estáveis, sem variação significativa com o número de bicamadas. A presença da heparina, um polissacarídeo altamente sulfatado e carregado negativamente, confere à superfície grupos hidrofílicos e cargas negativas, promovendo uma forte interação com a água e mantendo a hidrofilicidade dos filmes mesmo com o aumento da espessura.

Em relação à elipsometria, apenas os filmes CHI/HA-hep puderam ser analisados, devido a limitações na leitura dos filmes CHI/HA. As espessuras médias obtidas foram de 16,0 ± 2,0 nm (3,5 bicamadas), 23,0 ± 2,0 nm (5,5 bicamadas) e 59,5 ± 0,6 nm (8,5 bicamadas), indicando um aumento consistente com o número de bicamadas para essa condição. Embora os dados sugerem uma tendência de espessura crescente, não é possível generalizar esse comportamento para os demais filmes sem medições complementares. Ainda assim, a variação observada pode estar relacionada a alterações em propriedades como rugosidade e molhabilidade.

Após a caracterização dos filmes e a confirmação da incorporação de heparina na última camada, foram realizados testes de adesão celular para avaliar se a presença de heparina modificaria o perfil de adesão das células PC3. No entanto, devido a dificuldades experimentais no laboratório de biologia celular, apenas os filmes de 3,5 bicamadas foram testados. Os resultados (Figura 2), indicam perfis distintos de adesão celular nos filmes estudados. Como esperado, a última camada com ácido hialurônico (HA) favoreceu a adesão de células tumorais, enquanto a presença de heparina parece reduzir essa adesão. Essa diferença pode estar relacionada às propriedades físico-químicas dessas moléculas. O HA se liga diretamente ao receptor CD44, promovendo adesão celular. Já a heparina, devido à sua forte carga negativa dos grupos sulfato, pode gerar repulsão eletrostática com o filme ou as células, dificultando a adesão. Além disso, se incorporada na última camada, pode não estar suficientemente exposta para interagir eficazmente, ao contrário do HA, que possui uma interação mais favorável.

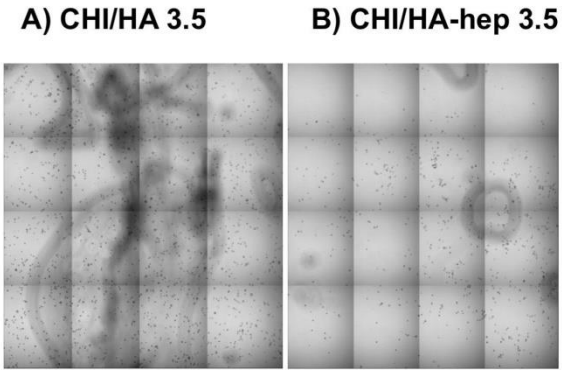

Figura 3 Imagens de microscopia confocal na lente transmitida dos filmes CHI/HA e CHI/HA-heparina, ambos com 3,5 bicamadas

CONCLUSÕES:

Neste projeto, investigou-se a influência da heparina na adesão celular quando incorporada a filmes de polieletrólitos produzidos via LbL. As análises por AFM e ângulo de contato indicaram que a heparina altera a rugosidade e aumenta a hidrofilicidade dos filmes, o que pode dificultar a adesão celular por barreiras físicas e eletrostáticas.

A menor adesão nos filmes com heparina pode também estar relacionada à ausência de HA na camada final, já que este polímero interage com o receptor CD44, favorecendo a adesão. A heparina, por outro lado, não apresenta essa interação específica.

Devido a limitações experimentais, apenas os filmes com 3,5 bicamadas foram testados, impedindo conclusões mais amplas. Para trabalhos futuros, recomenda-se continuar os testes com os filmes restantes e avaliar a incorporação conjunta de heparina e HA na camada final, buscando equilibrar propriedades antitrombogênicas e reconhecimento celular.

BIBLIOGRAFIA:

[1] E.B. Paglia, et. al. **Circulating Tumor Cells Adhesion: Application in Biosensors**. Biosensor (Basel), v. 13, n. 9, p. 882-882, 12 set. 2023

[2] L.A. Lino, et. al. **Use of biomakers in early cancer detection: A literature review.** Research, Society and Development, *[S. l.]*, v. 13, n. 8, p. e4013846517, 2024

[3] L. A. García-Hernández, et al. **Optical Detection of Cancer Cells Using Lab-on-a-Chip**. Biosensors, v. 13, n. 4, p. 439, 30 mar. 2023

[4] SANCHEZ-CANO, C.; CARRIL, M. **Recent Developments in the Design of Non-Biofouling Coatings for Nanoparticles and Surfaces**. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 3, p. 1007, 3 fev. 2020

[5] G. Decher, M. Eckle, J. Schmitt, B. Struth. **Layer-by-layer assembled multicomposite films.** Current Opinion in Colloid and Interface Science. 3 (1998) 32–39

[6] Decher, G. **Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites**. Science, 277(5330), 1232–1237, 1997

[7] Elzbieciak, M., Kolasinska, M., &Warszynski, P. (2008). **Characteristics of polyelectrolyte multilayers: The effect of polyion charge on thickness and wetting properties**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 321(1–3), 258–261.

[8] O.B.G. Assis, V.R. da Silva, **Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações**, Polímeros: Ciência e Tecnologia. 13 (2003) 223–228.

[9] ROCHA, M. et al. **Polysaccharide-based layer-by-layernanoarchitectonics with sulfated chitosan for tuning anti-thrombogenic properties**. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, v. 213, p. 112359–112359, 1 maio 2022.

[10] B.P. Toole. **Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue**. Nature Reviews Cancer. 4 (2004) 528–539.

[11] MISHRA, M. N. et al. **Structure, function and role of CD44 in neoplasia.** Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP, v. 23, n. 2, p. 267–272, 2019

[12]RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. **Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan**. Polymer, v. 40, n. 25, p. 7029–7032, dez. 1999.

[13] BIRAN, R.; POND, D. **Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 112, p. 12–23, mar. 2017.

[14] MI, H.-Y. et al. **Promoting endothelial cell affinity and antithrombogenicity of polytetrafluoroethylene (PTFE) by mussel-inspired modification and RGD/heparin grafting**. Journal of Materials Chemistry B, v. 6, n. 21, p. 3475–3485, 2018.