

Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais

Endocytosis and intracellular trafficking of nanomaterials

Ferreira L.A.B.¹, Radaic A.¹, Pugliese G.O.¹, Valentini M.B.¹, Oliveira M.R.¹, de Jesus M.B.¹

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Os avanços recentes da nanotecnologia têm aumentado a utilização de nanomateriais e nanodispositivos para diagnose, terapias e outros fins tecnológicos. O conhecimento da interação entre nanomateriais e meios biológicos permite a descoberta de aplicações mais racionais, podendo ajudar a entender e antever os seus efeitos adversos e citotóxicos. A endocitose é um processo biológico dependente de energia que está envolvida na internalização de nanopartículas pelas células, e depende de eventos orquestrados que requerem o funcionamento coordenado dos lipídios e proteínas da membrana plasmática. Estudos que visam investigar em detalhes a endocitose e o tráfego intracelular de nanopartículas são indispensáveis para compreensão de mecanismos celulares ainda inexplorados e permitem projetar novas funções, que conseqüentemente auxiliam na escolha de aplicações biomédicas da nanotecnologia. Nesse contexto, esta revisão visa conceituar as principais vias de endocitose utilizadas no estudo da internalização de nanomateriais em células eucarióticas. Além disso, alguns destinos intracelulares de nanomateriais serão discutidos para auxiliar nos estudos do processamento celular de nanopartículas e desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas.

Palavras-chave: Endocitose, nanopartícula, tráfego intracelular

ABSTRACT

Recent advances in nanotechnology have increased the use of nanomaterials and nanodevices for diagnostic, therapeutic and other technological applications. The knowledge about the interaction between nanomaterials and biological media allows the development of more rational applications, as well understand and anticipate adverse and toxic effects resulting from this interaction. Endocytosis is an energy-dependent biological process responsible for internalization of nanoparticles, which depends on orchestrated events that require lipids and plasma membrane proteins functioning. Studies that aim to investigate in detail the endocytosis and intracellular trafficking of nanoparticles are essential for understanding cellular mechanisms, which in turn help to select its biomedical applications. In this context, this review aims to conceptualize the main routes of endocytosis used to study the internalization of nanomaterials in eukaryotic cells. In addition, we discuss some intracellular trafficking of nanomaterials to aid in studies of the cellular processing and development of new therapeutic tools.

Keywords: Endocytosis nanoparticle, intracellular trafficking

¹Nano-Cell Interactions Lab., Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia CP 6109, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

Endereço para correspondência: Marcelo Bispo de Jesus E-mail: dejesusmb@gmail.com
<http://lattes.cnpq.br/9611381402490228>

COMO OS NANOMATERIAIS ENTRAM NAS CÉLULAS?

Estruturas em escala nanométrica, incluindo nanopartículas, são abundantes na natureza e estão presentes em nosso planeta há bilhões de anos¹⁻³. Os exemplos mais comuns nos quais podemos encontrar estruturas em nanoescala são leite, pólen, fumaça, emissões vulcânicas, além de alguns micro-organismos, como vírus e bactérias. A vida na Terra evoluiu em presença de nanoestruturas, de modo que a interação e internalização delas não é uma novidade. Existem até mesmo evidências de um mecanismo de internalização rudimentar em seres mais primitivos como bactérias⁴. O facto da interação entre nanomateriais e células não ser um evento recente na natureza leva-nos a pensar que, durante esse tempo, as células desenvolveram mecanismos para internalizar e, muitas vezes, metabolizar nanomateriais^{5,6}. Um exemplo disso é a defesa desenvolvida pelas células contra patógenos intracelulares, seguida da co-evolução dos patógenos para desenvolver estratégias moleculares para escapar desses mecanismos^{7,8}. Essa coevolução dificulta o desenvolvimento sistemas eficientes de carreamento de fármacos ou genes para liberação intracelular⁹. Nas células eucarióticas, animais e vegetais, o principal mecanismo de internalização, também utilizado pelos nanomateriais, é a endocitose.

A endocitose é um processo biológico dependente de energia, vital para células eucarióticas e altamente conservado entre tipos celulares e espécies. Ela acontece com o dinâmico rearranjo da membrana, dos microtúbulos, dos filamentos de actina e filamentos intermediários que são componentes do citoesqueleto da maioria das células eucarióticas¹⁰. Normalmente as células utilizam-se da endocitose para internalizar nutrientes, realizar transdução de sinais, modular a composição da membrana plasmática, reciclar recetores de membrana e fazer o transporte através de células endoteliais (transcitose)¹¹⁻¹³. Durante a endocitose, uma porção da membrana plasmática sofre invaginação e forma uma vesícula lipoproteica na porção interior da célula, que é então liberada no citoplasma. Portanto, essa vesícula é constituída de uma porção da membrana plasmática, bem como constituintes do meio externo confinados em uma vesícula intracelular (Fig. 1). A

endocitose pode ser classificada em fagocitose e pinocitose. A fagocitose é desempenhada por células do sistema imunológico, principalmente por fagócitos profissionais, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos^{11,14}. Nesse processo, as células internalizam materiais exógenos, geralmente com diâmetros maiores que 750 nm, para formar um fagossomo que será processado no interior da célula. Já na pinocitose a vesícula endocitada é chamada endossomo e essa via é virtualmente presente em todos os tipos celulares. A pinocitose pode ser dividida em endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose ou endocitose clatrina-caveolina independentes⁵.

A internalização de nanopartículas depende de eventos orquestrados que requerem o funcionamento coordenado dos lipídios e proteínas da membrana plasmática.

Vários aspetos são importantes para determinar a internalização de um nanomaterial, como o tipo de interação que ele estabelece com a membrana plasmática, sua forma e composição, além de seu tamanho e revestimento^{5,14,15}. A via de internalização será determinada por uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas dos nanomateriais (tamanho, composição química, carga, funcionalização da superfície, reatividade superficial, adsorção superficial, etc.)¹⁶. Nas seções seguintes essas vias serão melhor detalhadas e relacionadas com a endocitose de nanomateriais.

Endocitose mediada por Clatrina

A endocitose mediada por clatrina (EMC) é um dos mecanismos de internalização em células eucarióticas mais estudados e foi inicialmente observado por Roth e Porter em 1964 ao investigarem a endocitose de proteínas em gema de oocisto do mosquito *Aedes aegypti*¹⁷. Após alguns anos, Pearse (1975) avaliou a formação de vesículas em membranas sinápticas por microscopia eletrônica, observou uma estrutura proteica que revestia as vesículas em formação, a qual era capaz de interagir com outras moléculas e serem transportadas para compartimentos celulares específicos. Portanto, Pearse propôs que se tratava de um importante exemplo de uma classe de proteínas, denominando-a de clatrina¹⁸.

A EMC é considerada uma “rota clássica de internalização, responsável pela absorção de vários nutrientes essenciais à sobrevivência celular. Esta via endocítica também desempenha um papel importante na internalização de complexos de recetores de membrana, transportadores de metais, moléculas de adesão e os recetores de sinalização, citocinas, neurotransmissores, patógenos, antígenos e lipoproteínas¹⁹⁻²². Outras funções da EMC incluem a regulação negativa da sinalização celular por internalização ou degradação de recetores e manutenção da homeostase celular, por exemplo, por meio de bombas de íons de tráfico intracelular^{5,19,20,23}. O mecanismo de formação relacionado com a EMC envolve a formação de uma vesícula a partir da polimerização de uma proteína citosólica chamada clatrina-1, que também requer o auxílio proteínas adaptadoras AP180 e AP-2^{22,24}. A clatrina é uma proteína composta por estruturas denominada trisquélions, que possuem três cadeias pesadas (~190 kDa) e três cadeias leves (~25 kDa). Os trisquélions configuram-se para gerar uma estrutura hexagonal e pentagonal, que propicia a formação da curvatura da membrana²²⁻²⁴. A vesícula revestida por clatrina possui aproximadamente 100-200 nm de diâmetro, sendo formada a partir da constrição da membrana invaginada pela GTPase *dinamina*, que libera a vesícula no citoplasma^{5,24-27}. Outro fator importante é a polimerização de actina e miosina de classe I para gerar a invaginação da membrana, estruturação da vesícula revestida, recrutamento para o citoplasma e cisão da vesícula. Algumas proteínas adaptadoras e a proteína miosina VI também são essenciais para o transporte das vesículas para endossomos precoces¹⁰.

A EMC pode influenciar no destino ou degradação lisossômica de nanomateriais. Esse fator é relevante quando se utiliza nanopartículas como carreadores de fármacos ou genes. No uso de nanopartículas para carreamento de fármacos (*drug delivery*), a forma pela qual a partícula é endocitada pode fazer com que a nanopartícula seja degradada pelas enzimas lisossomais e não chegar ao alvo destinado. Estabelecer estratégias para promover o escape dos endossomos e evitar a degradação lisossomal é vital para o sucesso da terapia²⁸⁻³⁰. Por esse motivo, essa via de

internalização deve ser evitada quando o alvo do tratamento não são os lisossomos, ou quando o escape dos endossomos não querer a acidificação do endossomo.

Endocitose mediada por Caveolina

A endocitose mediada por caveolina é outro mecanismo que permite a internalização de nanopartículas. Caveolinas são proteínas de 22-24 kDa incorporadas na porção citosólica da membrana plasmática e com porções N- e C-terminais encontradas voltadas para o citoplasma³¹. Quando que essas proteínas são sintetizadas, são inseridas na membrana do retículo endoplasmático e levadas pela via secretora do retículo, formam complexos homo e heteroligoméricos no complexo de Golgi e são transportadas para a membrana plasmática como conjuntos de aproximadamente 100-200 moléculas de caveolina. É importante ressaltar que essas proteínas não estão funcionais até a sua chegada à membrana plasmática. Ao serem depositadas na membrana plasmática, desempenham seu papel biológico relacionado não só a endocitose, mas também a sinalização celular^{31,32}.

A caveolina é encontrada em invaginações da membrana plasmática em forma de balão com tamanho entre 50-100 nm denominada cavéolas³³. Encontram-se associadas às cavéolas, microdomínios de membrana enriquecidas com fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol, conhecidos como lipid rafts^{33,34}. As cavéolas são particularmente abundantes em células endoteliais, as quais podem constituir 10 a 20% das proteínas da membrana plasmática. São também encontradas em adipócitos, fibroblastos e células de músculo liso^{35,36}. Por outro lado estão ausentes em neurônios e leucócitos^{5,37}, ausentes também em algumas linhagens de células tumorais, como a linhagem de câncer de próstata PC3³⁸. A característica marcante da cavéola é a presença de uma proteína de membrana com estrutura grampo chamada caveolina-1 (Cav1), a qual é indispensável para a formação da cavéola. A Cav1 faz com que a cavéola assumira sua estrutura em forma de frasco e possa envolver moléculas que se ligam em sua superfície⁵. Até 144 moléculas caveolina foram apontadas na incorporação de uma única estrutura caveolar³⁵. Além da Cav1, que está presente na maioria das células, há outras

isoformas como caveolina-2 (Cav2), a qual auxilia e facilita a endocitose, porém não é essencial para a formação da cavéola; e a caveolina-3 (Cav3), que é expressa, especificamente, nos músculos estriados cardíacos e esqueléticos^{33,35}.

Proteínas como cavina, responsáveis pela indução da curvatura da membrana, e dinamina, que realiza a constrição da membrana plasmática liberando o endossomo no citoplasma, são essenciais para a endocitose. Também têm participação na endocitose mediada por caveolina as proteínas de membrana associadas à vesícula (VAMP2 - vesicle-associated membrane protein) e proteínas associadas ao sinaptossoma (SNAP - synapto-some-associated protein), que mediam a fusão do endossomo com outras vesículas intracelulares, além de outras proteínas como GTPases^{39,40}.

Essa via aparenta ser mais lenta *in vitro* quando comparada com a via de EMC. Contudo o mais importante é que, em alguns casos, essa via pode evitar a degradação lisossomal^{41,42}. Além disso, as vesículas de cavéola transportam e se fundem aos caveossomos ou corpos multivesiculares (MVBs), que possuem um pH neutro⁵. Por essa mesma razão, acredita-se que esta via é benéfica para a entrega de proteínas e DNA⁵. Entretanto, essa visão foi questionada após a descoberta de que os caveossomos possuem um pH ácido, ao contrário do que se acreditava e a discussão sobre a endocitose mediada por caveolina como uma via facilitadora da entrega de ativos permanece em aberto^{43,44}.

Há relatos na literatura de diversos nanomateriais internalizados pela via da caveolina. Essa via tem atraído grande atenção na nanomedicina por ter sido sugerida como via de escape à degradação lisossomal^{5,36,45}. Além disso, a endocitose mediada por caveolina é a via fisiológica para transcitose. Dessa forma, ela pode ser empregada para entrega trans-vascular de nanomateriais, por exemplo para a entrega de ativos no sistema nervoso central, onde há a necessidade de atravessar barreira hematoencefálica^{32,46-48}.

Macropinocitose

Macropinocitose pode ser definida como a internalização de grandes quantidades de mate-

rial extracelular, e é caracterizada pela movimentação da membrana plasmática induzida por uma ativação global do citoesqueleto de actina. Essa via envolve a transposição de grande quantidade de fluido externo através da formação de ondulações na extensão da membrana plasmática: as projeções citoplasmáticas se fundem a membrana como ondas resultando em grandes vacúolos endocíticos, heterogêneos em tamanho e morfologia, chamados macropinosomos^{49,50}. Os macropinosomos oferecem uma rota eficaz para a endocitose de macromoléculas não seletivas e são fáceis de distinguir de outras vesículas formadas durante a pinocitose, uma vez que são estruturas substancialmente maiores (0.5-10 μm), não revestidas e que se encolhem durante a sua maturação intracelular⁵¹.

Embora a definição de macropinocitose possa dar a impressão de ser um processo aleatório, trata-se na verdade de um processo celular muito complexo e bem coordenado⁴⁹. Sabe-se hoje que macropinocitose é um tipo de endocitose regulada por actina que, ao contrário dos mecanismos de endocitose acima discutidos, não é conduzida diretamente pela carga ou pelos recetores associados¹⁵. O processo é geralmente iniciado por estímulos externos através da ativação transiente de recetores de tirosina quinases (RTKs), que por sua vez ativam proteínas chave da sinalização celular, como Ras, PLC e PI3 quinase. Essas proteínas coordenam as mudanças em filamentos de actina, gerando uma agitação na membrana plasmática^{52,53} e essa perturbação na membrana se projeta sobre os fluidos no meio extracelular. Além disso, membros da família Rho e seus efetores também são requeridos para ativação da maquinaria de polimerização de actina e ondulação da membrana plasmática⁵⁰.

A macropinocitose tem um papel importante para a motilidade celular e obtenção de nutrientes, conseqüentemente, é bastante estudada no contexto da progressão e metástase de câncer⁵⁴⁻⁵⁷. É importante também para células diferenciadas, tais como os fagócitos profissionais que desempenham papéis significativos no sistema imunológico, como a endocitose de antígenos e a liberação de corpos apoptóticos e células necróticas. Além disso, tem sido sugerida como uma via endocítica eficaz para a inter-

nalização de drogas nas células. Curiosamente, a macropinocitose também pode ser induzida por vírus e bactérias. Esses organismos, assim como protozoários e príons^{52,54,58,59}, podem ativar essa via para invadir as células hospedeiras.

Em relação à internalização de nanopartículas, foi descrita recentemente a internalização de quantum dots através de macropinocitose⁶⁰. Nanopartículas mesoporosas de sílica são principalmente internalizadas em células HeLa por EMC, entretanto, a internalização via macropinocitose mostrou uma liberação mais eficiente de agentes quimioterápicos nessas células⁶¹. Ademais, a macropinocitose é descrita como uma das principais vias para a internalização de nanopartículas maiores (> 300 nm)⁶².

Endocitose independente de Clatrina e Caveolina

Atualmente, as vias de endocitose mediadas por clatrina, caveolina e macropinocitose podem ser consideradas vias clássicas, tanto pelo conhecimento em torno dessas vias, como ferramentas que dispomos para estudá-las. Entretanto, as células animais possuem outros mecanismos de endocitose, que atualmente são menos conhecidos, mas nos últimos anos vem se mostrando biologicamente relevante para o funcionamento celular⁶³. Inicialmente, estas vias foram caracterizadas em células de mamíferos, mas estudos mais recentes têm mostrado a existência dessas vias também em outros organismos modelos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum* e células vegetais⁶⁴⁻⁶⁷ e fungos⁶⁸.

Para mamíferos, já foi demonstrado na literatura que parte dos produtos extracelulares, cerca de 50% de toda atividade endocitária⁶⁹, são internalizados independentemente de clatrina e caveolina^{11,70,71}, como fluído extracelular, proteínas ligadas a Glicosilfosfatidilinositol, interleucinas, hormônios de crescimento entre outros compostos. Tais vias também são utilizadas para a invasão de patógenos e toxinas, além de possuírem grande participação na transdução de sinais celulares⁷².

As vias de endocitose independentes de clatrina e caveolina vêm sendo constantemente exploradas e descritas. Uma série de inibidores e ferramentas já vem sendo utilizadas para caracterizar essas vias^{5,45,73,74}. Entretanto, as distinções entre essas vias ainda não são tão

evidentes⁷⁵⁻⁷⁸ e há, ainda, dificuldade em encontrar inibidores específicos para caracterizá-las^{63,79-81}. Dentre as principais formas alternativas de endocitose podemos destacar: endocitose mediada por flotilina; endocitose mediada por CDC42; endocitose mediada por Arf6 e endocitose mediada por RhoA4. A seguir, cada uma dessas formas de endocitose é brevemente descrita.

Endocitose mediada por Flotilina

A família das flotilinas é composta por duas proteínas altamente homólogas – flotilina-1 e flotilina-2 também denominadas, respectivamente, de reggie-2 e reggie-1 – que cumprem várias funções como sinalização celular e interação com o citoesqueleto, além da endocitose. Porém não há consenso na literatura com relação aos detalhes moleculares do funcionamento dessa família de proteínas⁸². São proteínas associadas a membranas e também estão ligadas a microdomínios lipídicos, bem como as caveolinas. Por isso, flotilinas são consideradas marcadores desses microdomínios lipídicos⁸². Além disso, possuem grande homologia estrutural quando comparadas à caveolina-1⁸³, apesar de não possuírem nenhuma relação molecular em suas sequências⁸⁴.

Glebov et al. (2006)⁸³ colocalizaram flotilina-1 em cargas endocitadas e mostraram que o nocaute de flotilina-1 reduz a internalização da glicoproteína CD59 na subunidade B da toxina de cólera⁸³. Já Frick et al. (2007)⁸⁵ demonstraram, através de micrografias eletrônicas, que microdomínios ricos em flotilina-1 e flotilina-2 não coincidem com invaginações com caveolina-1, fortalecendo a ideia de que são vias distintas⁸⁵. Em estudo mais recente, Sorkina et al. (2013)⁸⁶ relatam que os microdomínios de flotilina podem funcionar também como moduladores de internalização por clatrina para transportador de dopamina (DAT) e propõem as flotilinas como moduladores que podem organizar microdomínios, regulando a mobilidade lateral de DAT⁸⁶. Entretanto, alguns detalhes moleculares da via, como a dependência ou independência de dinamina permanece em aberto⁸².

Para nanomateriais, foi demonstrado que a internalização de compostos catiônicos (como lipídios, poliaminas e peptídeos) pode ser mediada por de flotilina-1⁷², bem como poli-plexos catiônicos⁸⁷. Além desses exemplos, a

participação de flotilina-1 e -2 foi demonstrada na internalização de nanopartículas de sílica em células epiteliais de pulmão e células endoteliais⁸⁸. Com os avanços nos métodos de estudo e a descoberta de novos inibidores para essa via, em um futuro próximo essa via é forte candidata para se juntar as vias clássicas de endocitose.

Endocitose mediada por CDC42

A proteína controladora da divisão celular 42 (Cdc42) é membro da superfamília Ras e, como tal, a Cdc42 interage com diversos substratos, mas principalmente no crescimento celular, polimerização de actina, mudanças no citoesqueleto, processamento de RNA e endocitose⁸⁹.

Dentro do seu âmbito de ação, a Cdc42 é responsável pela internalização de proteínas ancoradas em Glicofosfatidilinositol (GPI) desagrupadas na membrana, como também internalização de grande volume de fluido extracelular e toxinas ligadas a lipídios⁹⁰. Cada vez mais estudos têm demonstrado que esse mecanismo pode constituir uma via alternativa a clatrina e caveolina^{11,90-92}. Nesse caso, o funcionamento da via endocítica se inicia com a porção C-terminal da Cdc42, ligando-se aos lipídios presentes na membrana celular¹¹, mais especificamente a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de sítios enriquecidos com esfingomielinas e colesterol, formando nanodomínios^{11,92}. Esses domínios nanométricos são essenciais para a internalização, pois parecem funcionar como sinalizadoras deste mecanismo de internalização⁹¹, além de serem sensíveis à remoção de colesterol da célula⁹⁰.

Com a formação dos nanodomínios, há o recrutamento das proteínas de membrana para regiões específicas, formando domínios maiores nos quais a endocitose aparenta ocorrer^{11,90}. Curvaturas da membrana ou de vesículas iniciais, são mediadas primariamente por carreadores independentes de clatrina (CLIC, do inglês, clathrin independent carrier) e caveolina^{11,90}. Essas curvaturas e vesículas se fundem e formam um compartimento endossomal enriquecido com proteínas ancoradas por GPI (também denominado de GEEC ou GPI-Enriched Endocytic Compartment). Neste ponto, a Cdc42 sinaliza para a polimerização de actina, gerando a invaginação alongada

característica desta via endocítica⁹⁰.

Essa via aparenta ser independente de dinamina, clatrina, caveolina, RhoA e receptor de interleucina-2 β ^{90,93}. Há inclusive, relatos na literatura de que ela pode se destinar não só para endossomos, como nas vias dependentes de clatrina e caveolina, mas também para o retículo endoplasmático e/ou para o complexo de Golgi. Entretanto, ainda há grande discussão sobre qual o destino final das vesículas CLIC/GEEC^{90,94-96}.

Sabharanjak et al. (2002)⁹⁰ observaram grande especificidade nos nanodomínios lipídicos formados na via dependente de Cdc42. Os autores verificaram que proteínas cujas âncoras de GPI foram trocadas por caudas transmembranares ou proteínas que não possuíam extensões citoplasmáticas foram excluídas da internalização⁹⁰. Porém, o maquinário celular associado para esta especificidade, a formação do próprio CLIC, sua natureza e os papéis de seus efetores principais ainda permanecem obscuros na literatura^{11,90}. Lu & Low (2002)⁹⁷ relatam que é possível utilizar recetores de folato para internalização de nanomateriais. Os recetores de folato são proteínas ancoradas por GPI e, uma vez ativados, internalizariam através da via Cdc42. A partir dessa ideia, Dixit et al. (2006)⁹⁸ produziram nanopartículas de ouro conjugadas com polietilenoglicol (PEG) modificado por ácido fólico e demonstraram internalização destas nanopartículas em células de câncer mas não significativa em linhagens não-cancerígenas⁹⁸. Entretanto, a relação entre os nanomateriais e essa via de internalização ainda carece de estudos e há poucas referências na literatura o papel e a relevância dessa via de internalização.

Endocitose mediada por ARF6

O fator 6 de ribosilação em adenosina difosfato (ARF6) pertence também à superfamília Ras de pequenas proteínas ligantes de GTP. Essa proteína interage e influencia diversos processos celulares, tais como o tráfego transmembranar e remodelamento da actina no citoesqueleto⁹⁹.

A via endocítica dependente de ARF6 tem sido descrita como uma das principais vias independente de clatrina e caveolina^{63,100,101}, pois para esta via tem sido demonstrado a internalização de diversos substratos com várias

atividades celulares distintas, tais como proteínas CD59 ligada a GPI, enzima carboxipeptidase E, receptor metabotrópico de glutamato⁷, proteína E de adesão dependente de cálcio (E-caderina), integrinas e proteínas do complexo principal de histocompatibilidade¹⁰²⁻¹⁰⁶. A super-expressão de ARF6 resulta na produção de ondulações na membrana e induz

macropinocitose¹⁰³. Esse aparato de internalização aparenta ser distinto das estruturas encontradas na via CLIC/GEEC^{11,99}.

A endocitose dependente de ARF6 aparenta ser independente de dinamina e seus endossomos podem se comunicar com compartimentos positivos com transferrina, endossomos positivos para Rab-5, o canal de potássio Kir3-4

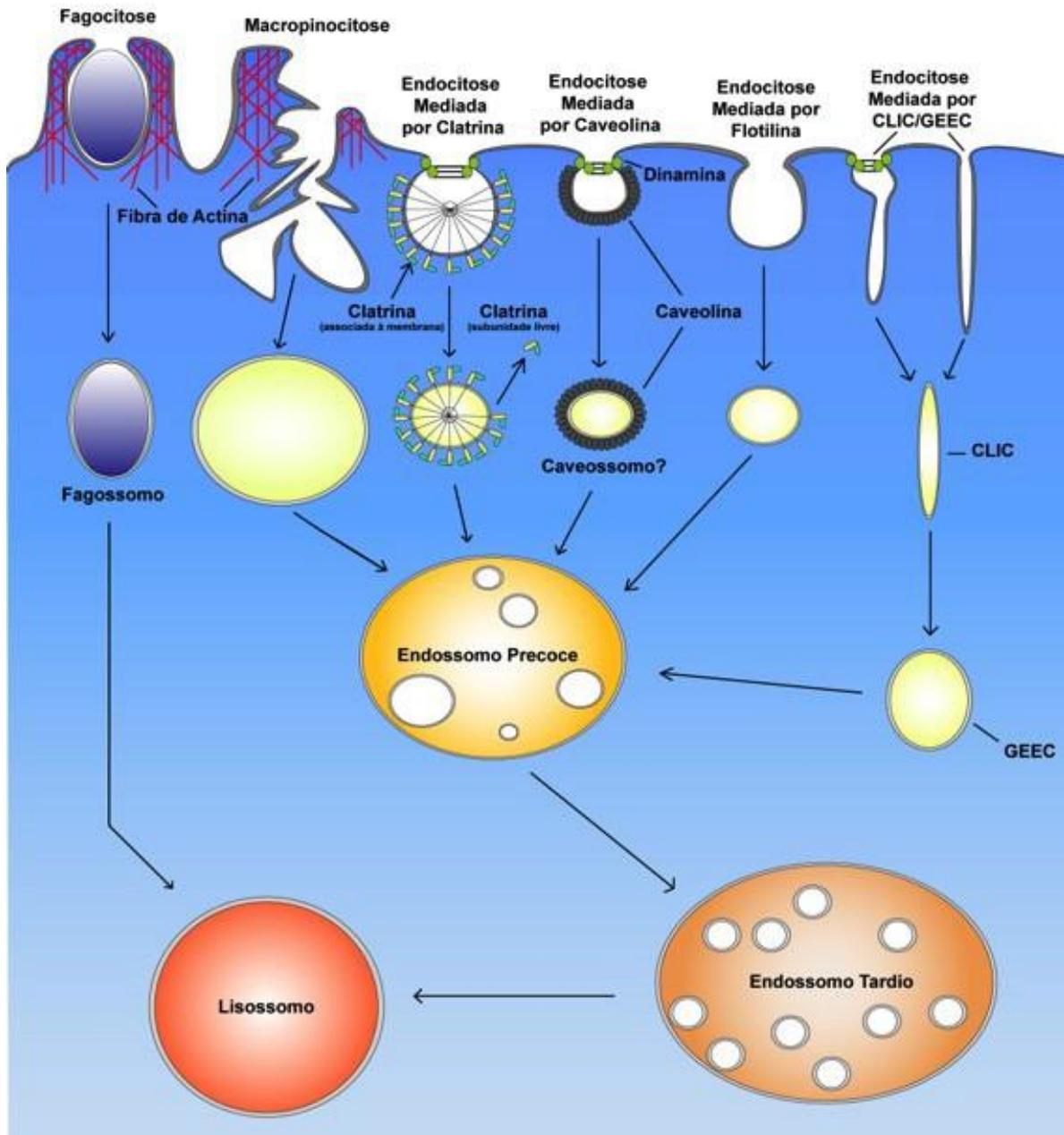


Figura 1. Principais vias de endocitose de nanopartículas em células eucarióticas. A etapa inicial representa principais vias de endocitose usadas para o estudo da internalização de partículas, que tem como consequência a formação de vesículas intracelulares - fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose clatrina e caveolina independentes (flotilina e Glic-Glec). A segunda etapa representa a via clássica de tráfego intracelular que envolve o processamento das nanopartículas a partir do amadurecimento do endossomo precoce, com destino à degradação lisossomal do material endocitado.

e a via de reciclagem dependente de ARF6^{11,106}, através da qual grande parte das proteínas endocitadas podem voltar à membrana plasmática⁹⁹.

Nesse caso, o modo de formação vesicular proposto é similar ao descrito para CLIC/GEEC. Arf6 ativa a enzima fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase que é responsável por gerar mais fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato. Então, Arf6, se liga ao Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato produzido, modificando a estrutura da membrana⁹⁹, e recruta proteínas membranares para o sítio em questão. Arf6 também se liga e ativa fosfolipase D, enzima que hidrolisa fosfatidilcolinas em ácido fosfatídico, provocando perturbações na membrana plasmática^{99,107-110}. Todas essas modificações facilitam a formação da invaginação e das vesículas⁹⁹. Por último, Arf6 modula e modifica as fibras de actina, formando a invaginação e a vesícula endocitária⁹⁹. Apesar da vasta gama de produtos internalizados por essa via e a sua importância celular, ainda é necessário identificar as proteínas diretamente ligadas com a Arf6 e auxiliam na modulação da via⁹⁹. Até o momento, não foi encontrado relatos de internalização de nano-materiais através esta via.

Endocitose mediada por RhoA

A função da proteína RhoA está atrelada à reorganização do citoesqueleto e polimerização de actina¹¹¹. Encontra-se associada com a regulação e controle de vesículas revestidas de clatrina em células HeLa, inibindo a internalização quando ativadas, assim como a estimulação e perturbações na membrana plasmática¹¹² e está intimamente ligada com a internalização de receptores de interleucina-2 β ¹¹³.

O mecanismo da via é semelhante ao da Cdc42 (CLIC/GEEC) explicitado anteriormente, porém já foi demonstrado que são mecanismos distintos, pois algumas proteínas chaves desta via, como a própria RhoA, a dinamina e os receptores de Interleucina-2 γ (sem as quais esta via é inibida), não estão presentes para a via Cdc42^{11,27,67,89,91,109,111}.

Essa via, quando ativa, provoca o recrutamento de receptores de interleucinas-2 γ através da formação de microdomínios lipídicos¹¹³. Neste ponto, a retirada de esfingolipídios e colesterol interrompe a internalização^{11,68,111}. Inicialmente, há curvatura da membrana ou

vesículas iniciais, que são mediadas primariamente por carreadores ou proteínas que auxiliam na sua formação²⁶. Essas curvaturas/vesículas se fundem, então, formando um compartimento endossomal enriquecido com domínios lipídicos e os recetores. Após isso, a proteína RhoA sinaliza para a modificação do citoesqueleto, gerando a invaginação na membrana plasmática. As invaginações dependentes de RhoA se mostram uniformes e com tamanhos entre 50-100 nm²⁶. Até o presente momento, a dinamina aparenta ser necessária para a cisão de invaginação, transformando-a numa vesícula endossômica^{11,111-113}.

Iversen et al. (2012)⁶⁰ demonstrou que a internalização de quantum dots associados com ricina acontece de forma independente de RhoA⁶⁰ e dependente de CAM^{114,115}. Isso ressalta que ainda são necessários novos estudos para elucidar não só o mecanismo de operação da via dependente de RhoA, assim como outras proteínas correlatas²⁶, o que pode auxiliar na aplicação desta via como forma de internalização de nanomateriais.

O QUE ACONTECE COM OS NANOMATERIAIS DEPOIS QUE ENTRAM NAS CÉLULAS?

Como discutido anteriormente, o material endocitado encontra-se confinado em uma vesícula lipoproteica no citoplasma. Portanto, essa vesícula é constituída de uma porção da membrana plasmática, bem como constituintes do meio externo confinados em uma vesícula intracelular (Figura 1). Através de uma série de eventos de fusão e fissão, seu conteúdo passa por um processo de maturação que envolve a diminuição do pH no lúmen da vesícula e a fusão com endossomos tardios até, por fim, chegar aos lisossomos, onde ocorre a degradação do material endocitado. É importante ressaltar que diferentes modelos foram propostos para explicar como o material endocitado passa de endossomo a lisossomo. Há pelo menos quatro teorias, i. maturação, ii. vesicular, transferência de conteúdo (kiss-and-run) e modelo híbrido, que podem explicar esse processo, a discussão a fundo dessas teorias foge do escopo desta revisão (para maiores detalhes ver¹¹⁶⁻¹¹⁸). Entretanto, essa é uma área em pleno desenvolvimento e os conhecimentos gerados por ela terão impactos significativos no transporte intracelular de nanomateriais. A rota

clássica (endossomo precoce, endossomo tardio, lisossomos) não é a única via de tráfego intracelular para os materiais endocitados. Esse processo depende de diversos fatores como a natureza química das nanopartículas, além de essas propriedades a distribuição intracelular de nanopartículas é dependente da linhagem celular estudada e também de tempo de exposição e das linhagens celulares¹¹⁹⁻¹²².

A acidez e a presença de uma variedade de enzimas líticas fazem dos lisossomos uma estação de degradação de materiais endocitados, uma vez que a degradação lisossomal é uma das maiores barreiras para as estratégias terapêuticas intracelulares^{9,10,123,124}. Como a maioria das aplicações de nanotecnologia não tem como objetivo o lisossomo, com exceção do tratamento de algumas disfunções lisossomais como a doença de Niemann-Pick, é necessário

que as terapias se valham de estratégias para escapar do endossomo. Isso pode ser alcançado através da funcionalização do nanomaterial, que pode desempenhar um importante papel na reorientação da partícula para subcompartimentos celulares específicos. A alteração de carga de superfície é uma das alternativas para escapar do lisossomo, promovendo a interação direta das nanopartículas com a membrana endossomal devido à inversão seletiva da carga de superfície (aniônica para catiônica)¹²⁵. A funcionalização com uma amina na superfície da partícula é um exemplo que pode auxiliar na liberação do material endocitado através de um evento denominado “esponja de prótons” que, através da protonação da amina ($pK \approx 6$) no ambiente ácido do endolisossomo, leva a um influxo de íons de cloro e de água, promovendo um desequilíbrio osmótico, propicia o inchaço

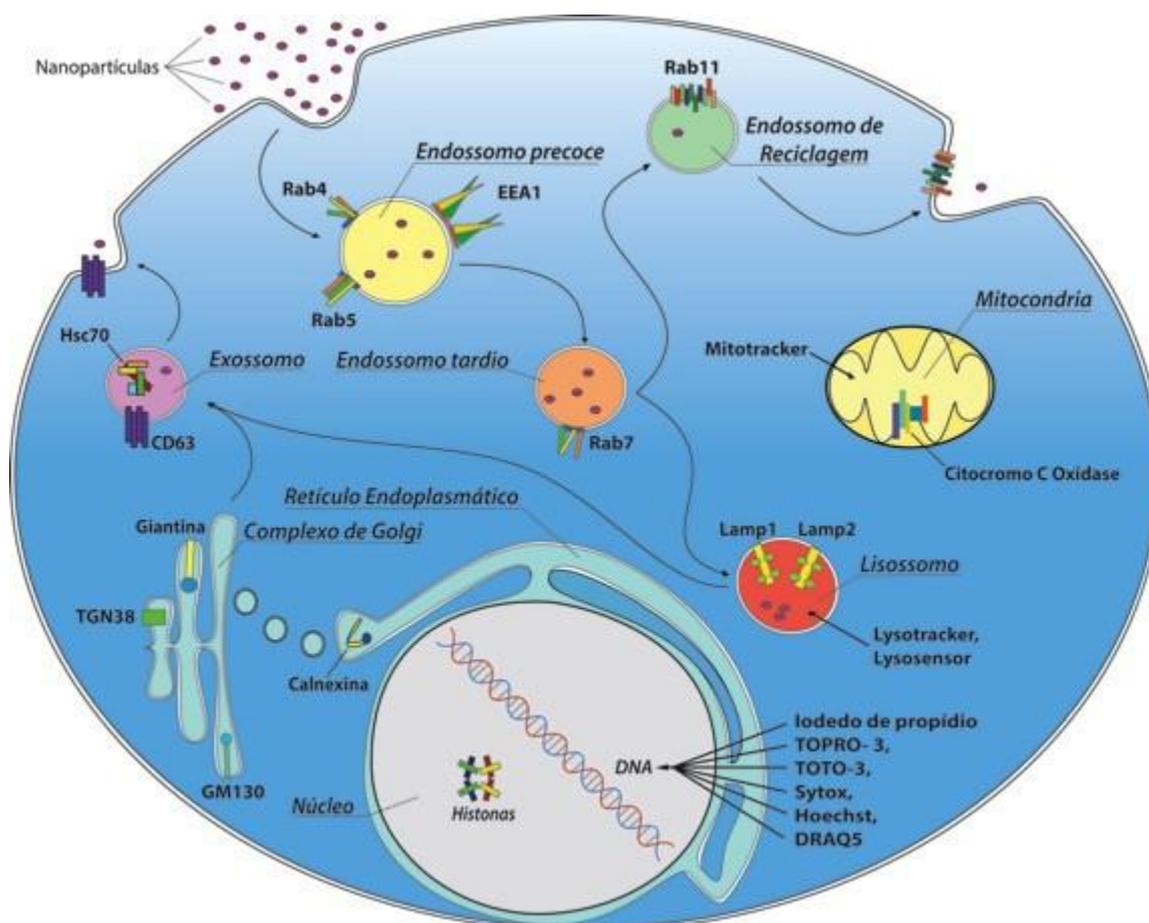


Figura 2. Principais proteínas residentes e marcadores de organelas no tráfego de nanopartículas. A figura ilustra alguns exemplos de proteínas utilizadas para o estudo dos destinos intracelulares de nanopartículas - Endossomos precoces: Rab4, Rab5, e EEA1; Endossomo tardio: Rab7; Lisossomos: Lamp1 e Lamp2; Endossomo de reciclagem: Rab11; Exossomos: CD63 e Hsc70; Complexo de Golgi: Giantina, GM130 e TGN38; Retículo endoplasmático: Calnexina.

do endolisossomo, pode levar a uma desorganização momentânea da membrana endossomal e consequente liberação do conteúdo do endossomo^{125,126}. Outra estratégia para escapar do endossomo inclui a conjugação de nanopartículas com proteínas fusogênicas como a melitina, que propicia a fusão de lipídios de membrana entre duas vesículas opostas, aproximando proteínas e lipídeos de membrana e leva a uma fusão do conteúdo luminal sem lise^{28,127}.

Outra estratégia interessante é a utilização de moléculas fotossensíveis, pois a radiação eletromagnética pode provocar a libertação dessas moléculas endocitadas para o citoplasma e contidas nas vesículas. Nesse processo, as membranas endossomais são altamente danificadas pela utilização fotossensibilizadores anfifílicos e o resultado é a subsequente libertação das nanopartículas aprisionadas para o citosol, como observado para a liberação de LDL intracelular de nanopartículas lipoproteicas¹²⁸.

Após o escape lisossômico, muitas estratégias também são utilizadas para determinar o destino final de um nanopartícula. As nanopartículas podem se direcionar para diversas organelas e isso dependerá de sua estabilidade frente a degradação lisossomal^{10,129}, características físico-químicas¹¹⁹, tempo de internalização¹³⁰ e afinidade nanopartícula-organela²⁸. O destino intracelular de uma nanopartícula pode ser de modo específico (nanopartícula-organela alvo), ou então de modo inespecífico para diversas organelas simultaneamente, por exemplo o núcleo, complexo de Golgi, retículos endoplasmáticos, mitocôndria, entre outros^{28,130}. Os estudos que visam investigar o tráfego intracelular de nanopartículas são essenciais para determinar a promoção de suas aplicações¹³¹. O conhecimento do destino intracelular de nanopartículas é muito importante na avaliação do efeito citotóxico, ou então, para o diagnóstico e terapia de diversas enfermidades. Para estudar esse processo de tráfego intracelular ou mesmo o destino intracelular de um nanomaterial, diversos marcadores de organelas ou estruturas vem sendo desenvolvidas. A Figura 2 resume os alvos desses marcadores. Essas estratégias utilizam-se de proteínas residentes ou marcadores de organelas, como Rab4, Rab5, e EEA1 para endossomos precoces; Rab7 para endossomos tardios; Rab11 para endossomos de reciclagem; CD63 e Hsc70 para exossomos; Giantina, GM130 e TGN38 para

complexo de Golgi, Calnexina para retículo endoplasmático e Lamp1 e Lamp2 para lisossomos. Geralmente são empregadas técnicas de microscopia (de fluorescência, eletrônica, de força atômica), principalmente microscopia confocal, para a colocalização de organelas e nanomateriais, para assim traçar o caminho percorrido nas células.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de nanomateriais vem se tornando cada vez mais expressiva, portanto, concomitantemente há uma crescente preocupação a respeito do uso, manipulação e eliminação desses materiais. Muitas interações fundamentais entre nanomateriais e o meio biológico ainda não são completamente compreendidas. Em grande parte dos estudos sobre a aplicação de nanomateriais, há lacunas sobre os mecanismos moleculares envolvidos. O conhecimento da endocitose e os destinos intracelulares de nanopartículas são indispensáveis para projetar aplicações terapêuticas, além de ser útil na avaliação citotóxica desses materiais. O estudo do tráfego celular tem grande importância no desenvolvimento de nanocarreadores, pois quando definido o alvo intracelular, é possível aprimorar a aplicação terapêutica, consequentemente, fornecer tratamentos médicos mais eficazes.

A endocitose é um processo fisiológico que foi moldado pelo processo evolutivo para desempenhar um papel biológico diferente em cada tipo celular, que está diretamente ligado a função que aquela célula realiza em seu tecido de origem. Por isso é altamente esperado que esse processo seja dependente do tipo celular. Na maioria das vezes, as nanopartículas são internalizadas por mais de uma via (por ex. clatrina e caveolina) o que pode resultar em respostas biológicas distintas, uma vez que uma via pode levar a uma degradação mais eficiente. Esses fatores devem ser levados em consideração no estudo da interação das nanopartículas com o ambiente celular. Essa é uma área multidisciplinar que apesar de não ser completamente compreendida atualmente está em pleno desenvolvimento, bem como as técnicas e ferramentas utilizadas nessa área, da qual espera-se no futuro próximo grandes descobertas e uma importante contribuição para uma aplicação segura e eficiente de nanomateriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointer-phases* 2007;2(4):MR17-MR71.
2. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113(7): 823-839.
3. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part. *Fibre Toxicol.* 2005; 2(1): 8.
4. Jermy A. Evolution: Bacterial endocytosis uncovered. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(8): 534-535.
5. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release* 2010; 145(3): 182-195.
6. Pugliese G de O, de Jesus MB. A nanotecnologia é tudo isso? *Ciênc. Hoje*. Submetido (em publicação).
7. Mostowy S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell. Microbiol.* 2013; 15(3): 395-402.
8. Randow F. How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion. *Autophagy* 2011; 7(3): 304-309.
9. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Controlled Release* 2011; 151(3): 220-228.
10. Rivolta I, Panariti, Miserocchi. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2012:87.
11. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78(1): 857-902.
12. Low PS, Chandra S. Endocytosis in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994; 45(1): 609-631.
13. Šamaj J, Read ND, Volkman D, Menzel D, Baluška F. The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.* 2005; 15(8): 425-433.
14. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* 2011; 7(10): 1322-1337.
15. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41(7): 2718.
16. Jiang X, Dausend J, Hafner M, et al. Specific Effects of Surface Amines on Polystyrene Nanoparticles in their Interactions with Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* 2010; 11(3): 748-753.
17. Roth TF, Porter KR. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *L. J. Cell Biol.* 1964; 20(2): 313-332.
18. Pearse BMF. Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 1975; 97(1): 93-98.
19. Von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, et al. Role of the Clathrin Terminal Domain in Regulating Coated Pit Dynamics Revealed by Small Molecule Inhibition. *Cell* 2011; 146(5): 841.
20. Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekens R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 2004; 377(Pt 1): 1-16.
21. Subtil A, Hémar A, Dautry-Varsat A. Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J. Cell Sci.* 1994; 107(12): 3461-3468.
22. Higgins MK, McMahon HT. Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27(5): 257-263.
23. Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis. *Science* 1999; 285(5425): 215-220.
24. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011; 12(8): 517-533.
25. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 353(1): 26-32. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.135.
26. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 2010; 20(3):256-275. doi:10.1038/cr.2010.19.
27. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 2008; 412(3): 415. doi: 10.1042/BJ20080474.
28. Paulo CSO, Pires das Neves R, Ferreira LS. Nanoparticles for intracellular-targeted drug delivery. *Nanotechnology* 2011; 22(49):494002. doi:10.1088/0957-4484/22/49/494002.
29. De Jesus MB. Utilização de ferramentas nanotecnológicas para a indução de morte em células de câncer de próstata. 2006. Available at: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/103845/utilizacao-de-ferramentas-nanotecnologicas-para-a-inducao-de-morte-em-celulas-de-cancer-de-prostata/> Accessed May 13, 2014.
30. Radaic A, Paula E de. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para o carreamento conjunto do gene para PTEN e mitoxantrona em

- células de câncer de mama e de próstata. 2012. Available at: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000897481>. Accessed May 22, 2014.
31. Couet J, Belanger MM, Roussel E, Drolet M-C. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 49(3): 223-235.
32. Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(4): 177-186.
33. Lajoie P, Nabi I r. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2007; 11(4): 644-653.
34. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, et al. Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromol. Biosci.* 2008; 8(12): 1135-1143.
35. Bastiani M, Parton RG. Caveolae at a glance. *J. Cell Sci.* 2010; 123(22): 3831-3836.
36. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66(17): 2873-2896.
37. Scherer PE, Lewis RY, Volonté D, et al. Cell-type and Tissue-specific Expression of Caveolin-2 Caveolins 1 and 2 Co-localize and Form a Stable Hetero-Oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(46): 29337-29346.
38. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, et al. PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function. *Cell* 2008; 132(1): 113-124.
39. Carver LA, Schnitzer JE. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3(8): 571-581.
40. Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial Caveolae Have the Molecular Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(24): 14399-14404.
41. Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40-Induced Internalization of Caveolae. *Science* 2002; 296(5567): 535-539.
42. Parton RG, Richards AA. Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms. *Traffic* 2003; 4(11): 724-738.
43. Parton RG, Howes MT. Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3): 439-441.
44. Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3): 615-629.
45. Xiang S, Tong H, Shi Q, et al. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Controlled Release* 2012; 158(3): 371-378.
46. De Jesus MB, Radaic A, Hinrichs WLJ, et al. Inclusion of the helper lipid dioleoyl-phosphatidylethanolamine in solid lipid nanoparticles inhibits their transfection efficiency. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014; 10(2): 355-365.
47. Agarwal A, Lariya N, Saraogi G, Dubey N, Agrawal H, Agrawal G. Nanoparticles as Novel Carrier for Brain Delivery: A Review. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15(8): 917-925.
48. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiol. Rev.* 2003; 83(3): 871-932.
49. Falcone S, Cocucci E, Podini P, Kirchhausen T, Clementi E, Meldolesi J. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* 2006; 119(22): 4758-4769.
50. Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* 2007; 11(4): 670-684.
51. Orth JD, McNiven MA. Get Off My Back! Rapid Receptor Internalization through Circular Dorsal Ruffles. *Cancer Res.* 2006; 66(23): 11094-11096.
52. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11(5): 510-520.
53. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 1995; 5(11): 424-428.
54. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* 2011; 89(8): 836-843.
55. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 2013; advance online publication.
56. Gu Z, Noss EH, Hsu VW, Brenner MB. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J. Cell Biol.* 2011; 193(1): 61-70.
57. Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, Polo S, Scita G, Fiore PPD. Endocytosis and Signaling: Cell Logistics Shape the Eukaryotic Cell Plan. *Physiol. Rev.* 2012; 92(1): 273-366.