

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Protagonismo das lectinas em
nanoformulações
Qual a abordagem?**

Tiago Miguel Silva Nobre Guerreiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2016/2017

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Protagonismo das lectinas em
nanoformulações
Qual a abordagem?**

Tiago Miguel Silva Nobre Guerreiro

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientadora: Professora Doutora Ana Cristina Ribeiro (FFUL)

Ano 2016/2017

Índice:

1. Introdução	12
1.1 Lectinas	12
1.2 Classificação	14
1.3 Nanoformulações	19
1.3.1 Nanopartículas poliméricas	21
1.3.2 Lipossomas	24
1.3.3 Nanopartículas lipídicas sólidas	25
1.3.4 Nanopartículas metálicas	25
1.3.5 Nanopartículas à base de sílica	25
1.3.6 Micelas poliméricas	26
1.3.7 Dendrímeros	26
1.3.8 <i>Quantum dots</i>	27
1.4 Enhanced permeation and retention effect	27
1.5 Mecanismo ativo e passivo das nanopartículas	29
1.6 Aplicações das nanopartículas	31
2 Métodos de pesquisa	32
3 Nanoformulações conjugadas	33
3.1 História do conceito de "bala mágica"	33
3.2 Nanopartículas dirigidas	33
3.2.1 Nanopartículas com interação lectina-hidrato de carbono	35
3.2.1.1 <i>Direct lectin targeting</i>	35
3.2.1.2 <i>Reverse lectin targeting</i>	35
3.3 Administração oral de nanopartículas	36
3.3.1 Membrana mucosa intestinal	37
3.3.2 Células M	38
3.3.3 Sistemas de transporte Bioadesivos	40
3.3.3.1 Mucoadesivos de primeira geração	40
3.3.3.2 Mucoadesivos de segunda geração	40
4 Aplicações de nanopartículas conjugadas com lectinas	42
4.1 Tuberculose	43
4.2 Cancro	45
4.2.1 Leucemia mieloide crónica	45

a) Imagem por ressonância magnética <i>in vitro</i>	47
b) Avaliação <i>in vitro</i> da absorção dos conjugados de nanopartículas em células K562 por citometria de fluxo	47
c) Aplicações farmacocinéticas <i>in vivo</i>	48
d) Citotoxicidade do conjugado lec-pac-MNP nas células K562	48
e) Mecanismo de ação do paclitaxel	49
4.3 Diabetes <i>mellitus</i>	50
4.4 Doença de Alzheimer	54
4.5 Colite Ulcerosa	57
4.6 Leishmaniose visceral	58
4.7 Resposta autoimune	59
4.7.1 Conjugados de TP5 em nanopartículas de PLGA com WGA	59
4.8 Infecções bacterianas	61
5 Aplicações de nanopartículas conjugadas com hidratos de carbono	64
5.1 Resposta imune descontrolada	64
5.2 Cancro	66
5.2.1 Cancro da próstata	67
5.2.2 Carcinoma hepatocelular	68
5.2.3 Evasão do sistema mononuclear fagocitário	69
6 Lectinas encapsuladas em nanopartículas	72
7 Outras aplicações de nanopartículas com interações lectina-hidrato de carbono	
74	
7.1 Detecção de bactérias	74
7.1.1 Biosensores 3D de nanoarranjos de ZnO	75
7.1.2 Detecção inespecífica de bactérias por <i>microarray</i> de anticorpos IgGs com AuNP-RCA-ConA	77
7.1.3 AuNPs com WGA e LCA com detecção por fotometria	78
7.2 Espaçadores	79
8 Toxicologia das nanopartículas	80
9 Conclusões	82
Referências Bibliográficas	84
A1. Apoptose	96
A2. Lectinas Tipo C	97

A3. Nanoformulações.....	98
A4. TP5.....	99
A5. Leucemia.....	100
A6. Cancro.....	101

Agradecimentos

Queria agradecer a todas as pessoas que ajudaram a concretizar esta monografia. É dedicada à minha família, que tanto me apoiou ao longo dos anos, para acabar o curso. Queria agradecer também à minha namorada Joyce, que tanto me apoiou durante este tempo todo para conseguir chegar até ao fim desta etapa.

Um grande obrigado à Professora Doutora Ana Cristina Ribeiro, que foi uma excelente orientadora e mentora para todo o trabalho, tendo acreditado nas minhas capacidades desde o 4ºano, no âmbito da disciplina de Toxicologia. Fica ainda um grande abraço para o Vítor, que passou mais de um mês comigo no IST, a escrevermos as nossas monografias.

Queria agradecer ao André, à Florine e ao Francisco por terem vindo me apoiar na defesa e assistir ao final do meu percurso académico. Está Feito!

Abreviaturas

WGA: *Wheat germ agglutinin*

LTA: *Lotus tetragonolobus agglutinin*

PNA: *Peanut agglutinin*

ConA: Concanavalina A

TL: *Tomato Lectin*

CRD: Domínio de reconhecimento de hidratos de carbono

RE: Retículo endoplasmático

NP/NPs: Nanopartícula/Nanopartículas

PEG: Polietilenoglicol

HPMA: *N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide*

PLA: Ácido poliláctico

PLGA: Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PEG-PLA: Polietilenoglicol-ácido poliláctico

PGA: poli(ácido glicólico)

QD: *Quantum dots*

EPR: *Enhanced permeation and retention effect*

TACAs: *Tumor-associated carbohydrate antigens*

MNPs: *Magnetic nanoparticles*

bFGF: *basic fibroblast growth factor*

STL: *Solanum tuberosum lectin*

AgNPs: Nanopartículas de prata

Siglec: *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*

STALs: *Siglec-engaging tolerance-inducing antigenic liposomes*

Índice de figuras:

Figura 1.1 Estrutura de lectinas: Merolectinas, hololectinas e quimerolectinas	15
Figura 1.2 Classificação das lectinas de acordo com a sua especificidade de ligação ao hidrato de carbono	16
Figura 1.3 O domínio extracelular de ligação ao hidrato de carbono (CRD) define a classificação da lectina	18
Figura 1.4 Alguns tipos de nanopartículas	20
Figura 1.5 Mecanismo da entrega farmacológica das nanopartículas	21
Figura 1.6 Esquema dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: Nanocápsulas e nanoesferas	22
Figura 1.7 Encapsulação, conjugação e adsorção de um antigénio à superfície das nanopartículas poliméricas	23
Figura 1.8 Lipossoma como sistema de entrega de fármacos	24
Figura 1.9 Mecanismo de ação dos dendrímeros	26
Figura 1.10 O efeito de <i>enhanced permeability and retention</i> em meio tumoral	28
Figura 1.11 Mecanismo ativo e passivo das nanopartículas	29
Figura 1.12 Vias de administração mais comuns de algumas nanopartículas	31
Figura 3.1 Conjugações possíveis nas nanopartículas	34
Figura 3.2 Internalização de nanopartículas via endocitose mediada por ligação ao receptor membranal em uma célula tumoral	34
Figura 3.3 As vias para absorção no epitélio intestinal (membrana mucosa)	37
Figura 3.4 Evasão das bombas de efluxo	41
Figura 4.1 Esquema de uma nanopartícula magnética e as suas conjugações possíveis	46
Figura 4.2 Intensidade de fluorescência média através de citometria de fluxo	47
Figura 4.3 Avaliação da biodisponibilidade <i>in vivo</i>	48
Figura 4.4 Esquema das interações entre as micropartículas alginato-WGA e a mucina de porco immobilizada num biosensor de <i>surface plasmon resonance</i>	52
Figura 4.5 Efeito hipoglicémico em ratos diabéticos após administração oral de solução de insulina, micropartículas de alginato livres e micropartículas de alginato-WGA	53
Figura 4.6 Níveis de atividade de AchT no hipocampo de ratos com Alzheimer tratados com várias preparações contendo bFGF	56
Figura 4.7 Cortes histológicos de ratos saudáveis e de ratos com Alzheimer tratados com preparações bFGF	57
Figura 4.8 Interação de TP5-PLGA e TP5-PLGA-WGA com o jejuno e ileón	60
Figura 4.9 Atividade antibacteriana da lectina, nitrato de prata e nanopartículas de Ag revestidas por lectinas em várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	62
Figura 4.10 Mecanismo de ação das nanopartículas de Ag revestidas com lectinas	63

Figura 4.11 Inibição de crescimento bacteriano induzido pelas AgNPs revestidas com lectinas em várias bactérias	63
Figura 5.1 Esquema das nanopartículas de STAL e STAL+Rapamicina	66
Figura 5.2 Expressão de M6PR em células normais e cancerígenas da próstata	68
Figura 5.3 Esquema mostrando diferença entre AuNPs não modificadas e AuNPs modificadas com ácido siálico	70
Figura 5.4 Distribuição <i>in vivo</i> das AuNPs	71
Figura 6.1 Avaliação do efeito de Cra livre em solução e de Lipossomas encapsulados com Cra em ratos com Sarcoma 180	73
Figura 7.1 Construção e mecanismo de ação do biosensor 3D	75
Figura 7.2 Imagens do biosensor ZnO-NR em microscópio de varimento eletrônico	76
Figura 7.3 Funcionamento do <i>microarray</i> com IgG e AuNPs-RCA/ConA	77
Figura 7.4 Imagem de microscopia electrónica de transmissão. As AgNPs com lectinas agregam após interagirem com a bactéria (<i>St.aureus</i>)	78
Figura 7.5 Esquema da preparação da matriz e da imobilização celular	79

Índice de tabelas:

Tabela 1.1 Classificação das lectinas de acordo com a sua evolução genética	16
Tabela 3.1 Algumas lectinas que já foram utilizadas para ligação às células M	39
Tabela 4.1 Valores de IC ₅₀ (Concentração inibitória média) para a inibição do ciclo celular das células K562	49
Tabela 4.2 Grupos de ratos e tratamentos recebidos	55

Resumo

As nanoformulações são formulações farmacêuticas constituídas por nanopartículas de 200 a 500 nm. Elas permitem a encapsulação, conjugação ou adsorção de fármacos que são fracamente absorvidos, possuem baixa biodisponibilidade, são altamente degradados pelo organismo ou que possuem elevada toxicidade. As nanopartículas protegem o fármaco até atingir o seu alvo, melhorando significativamente a sua eficácia e perfil de liberação.

As lectinas são proteínas cuja função é o reconhecimento e ligação a estruturas glicídicas. Estas ligações medeiam interações entre células, síntese de glicoproteínas e possuem funções reguladoras. Por serem ligações comuns no corpo e apresentarem alta afinidade e alguma especificidade, poderão ser aproveitadas para servirem como ligandos nas nanopartículas.

Todas as células expressam à sua superfície receptores e hidratos de carbono, o que possibilita a construção de nanopartículas específicas a um tipo celular. Para mais, uma célula maligna poderá apresentar padrões alterados de receptores ou expressão glicosídica, comparado a uma célula normal. Estas diferenças entre células são exploradas pelas nanopartículas para a entrega do fármaco. As nanopartículas conjugadas a lectinas/hidratos de carbono vão ter uma afinidade específica ao interagirem com as estruturas e receptores da célula-alvo.

Esta monografia irá abordar várias nanopartículas desenvolvidas até agora, no uso em terapia e diagnóstico, e as consequências e perspectivas das nanopartículas como formulações farmacêuticas do futuro.

Palavras-chave: Lectinas; Nanoformulação; Nanopartículas; Mucoadesão; Hidratos de carbono

Abstract

Nanoformulations are drug delivery systems that consist in nanoparticles whose sizes can range from 200 to 500 nm. They allow the encapsulation, conjugation or adsorption of drugs that are poorly absorbed, have low bioavailability, are degraded in the body or possess high toxicity. Nanoparticles protect the drug until it reaches its target, which improves their efficiency and release profile.

Lectins are proteins that recognize and bind to sugar moieties. These bonds mediate cell-to-cell interactions, glycoprotein synthesis and have regulating functions. Because lectin-carbohydrate interactions are very common and have high affinity and some specificity, they can be used as nanoparticle ligands.

All cells have carbohydrates and receptors at their surfaces. This allows the making of nanoparticles that are very specific to a type of cell. Furthermore, a malignant cell expresses different glycosylation patterns or receptors than a healthy cell. These differences between cells are exploited by the nanoparticles for drug-delivery. These lectin/carbohydrate conjugated nanoparticles are going to bind specifically to the structures and receptors of their target cells.

This monograph will discuss several nanoparticles that have so far been developed for therapy and diagnostics, and the consequences and prospective of nanoparticles as the drug delivery system of the future.

Keywords: Lectins; Nanoformulations; Nanoparticles; Mucoadhesion; Carbohydrates

1. Introdução

1.1 Lectinas

As lectinas foram descritas primeiramente por Hermann Stillmark em 1888, quando observou as propriedades aglutinantes da ricina, uma lectina tóxica que é extraída da semente do rícino (1). Na Segunda Guerra mundial, surgiu o interesse de distinguir as várias tipologias de sangue para a realização de transfusões sanguíneas. Nos anos 50, estas aglutininas foram então chamadas de lectinas, um termo que vem da palavra *legere* em Latim, que significa "escolher" ou "selecionar". A escolha do nome deve-se à capacidade das lectinas de conseguirem diferenciar os tipos sanguíneos pela especificidade na aglutinação dos eritrócitos (2).

As lectinas são um grupo diverso de proteínas e glicoproteínas que se ligam a hidratos de carbono específicos com elevada afinidade e de maneira reversível. Não têm atividade enzimática e são de origem não imunológica (3). Possuem um papel muito importante no reconhecimento celular (4), conseguindo diferenciar entre estruturas glicinas complexas nas membrana celulares, decifrando o glicoma celular. A ligação ao hidrato de carbono é possível porque as lectinas possuem um domínio de reconhecimento de hidratos de carbono (**CRD**) dentro da sua estrutura polipeptídica (3).

As lectinas são compostas por 2 ou 4 subunidades idênticas (ou quase idênticas), com massas moleculares de 25 a 30 kDa. Cada uma das subunidades contém um CRD (iguais entre si e não catalíticas), catiões bivalentes, geralmente Ca^{2+} e Mn^{2+} (5,6). Denominam-se por poliespecíficas ou monoespecíficas conforme se ligam a polissacáridos ou monossacáridos. Após a ligação, as lectinas têm capacidade

de regular interações célula-célula, célula-matriz, interações célula-substrato, actividade mitogénica, imunogenicidade e codificar informação biológica. (1,7,8).

Os hidratos de carbono são compostos orgânicos de carbono, hidrogénio e oxigénio que seguem a fórmula $[C(H_2O)]_n$. Estão presentes na superfície de todas as células e servem de marcadores celulares para o ambiente externo. Existem dois tipos de glicanos ligados às proteínas: Os que estão ligados ao grupo amina da asparagina, referidas como oligossacáridos com ligação *N*-glicosídica, e os que estão ligados ao grupo hidroxilo da serina ou treonina, referidos como oligossacáridos com ligação *O*-glicosídica (9). Ao contrário dos nucleótidos e aminoácidos, que se ligam linearmente, os monossacáridos dos oligossacáridos e polissacáridos ligam-se uns aos outros em diferentes pontos, formando ramos. Por exemplo, 2 monossacáridos iguais podem formar 11 dissacáridos diferentes (10).

Os glicoconjugados são moléculas onde uma ou mais unidades de polissacáridos estão ligados covalentemente a outras espécies químicas (9). Os glicoconjugados podem dividir-se em glicoproteínas, glicopéptidos, peptidoglicanos, glicolipidos, glicósidos e lipopolisacáridos (11). A maioria das células está coberta pelo glicocálice: é uma cobertura de oligossacáridos ou polissacáridos, que fazem parte da cadeia lateral das glicoproteínas ou glicolipidos projectados pela membrana plasmática. A estrutura destas glicoproteínas define a maturidade de uma célula, o seu estado de diferenciação e serve para o organismo distinguir entre as suas células saudáveis, células transplantadas, malignas ou organismos invasores (7).

As células cancerígenas utilizam as pequenas diferenças no hidratos de carbono para escapar ao reconhecimento pelas células da imunidade. Para mais, o cancro está associado a alterações de glicosilação em glicoproteínas e glicolipidos, denominada de **aberração glicómica** (11). A glicosilação consiste na ligação covalente de um hidrato de carbono a uma proteína, lipido ou outro hidrato de carbono, catalizada por glicosiltransferases. As lectinas ao reconhecerem os hidratos de carbono expressos pelos glicoconjugados, vêm os padrões de ligação alterados de acordo com as mudanças de expressão glicoproteica da membrana celular que acompanha a maturação celular ou doença. As lectinas podem ser assim usadas como marcadores de tecidos em transformação neoplásica, podendo assim prever lesões de uma maneira não invasiva (11).

Por exemplo, Melo-Júnior *et al.* (2004) descobriram que as lectinas *Wheat germ agglutinin (WGA)* e *Lotus tetragonolobus agglutinin (LTA)* são marcadores histológicos promissores para diferenciar entre um epitélio normal e um inflamatório, numa colite ulcerativa. A doença está associada a anormalidades na síntese e secreção de mucinas, as quais vão alterar o metabolismo de lípidos, hidrato de carbonos e proteínas, levando à lesão dos tecidos e conseqüente inflamação. A WGA e LTA reconheceram as porções de hidrato de carbono *N*-acetilglucosamina e L-fucose expressas pelos glicoconjugados nas células da colite ulcerativa (7).

1.2 Classificação

Em 1972, Sharon e Lis classificaram todas as lectinas conhecidas até à data, dando início à era moderna da lectinologia (1,12). A classificação mais comum das lectinas é pela sua fonte. São prevalentes em animais e plantas. Também estão presentes em vírus e bactérias, onde ganham o nome de hemaglutininas ou adesinas. (1). As lectinas estão presentes em quase todas as espécies de plantas mas são mais abundantes nas leguminosas (1). Apresentam no entanto uma grande especificidade para uma variedade elevada de estruturas de hidratos de carbono no tecido animal (9).

1.2.1 Classificação de acordo com a estrutura

As lectinas de plantas podem ser divididas em vários grupos de acordo com a sua estrutura molecular (Figura 1.1(3)) :

-**Merolectinas**: lectinas que possuem apenas um CRD. São proteínas pequenas que pela sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.

-**Hololectinas**: lectinas que possuem dois ou mais CRDs com estrutura homóloga (por exemplo a ConA).

- **Quimerolectinas**: São proteínas de fusão que possuem um CRD em tandem com um domínio com atividade catalítica que age de forma independente do CRD.

Dependendo do número de CRDs, as quimerolectinas agem como uma merolectina ou hololectina.

- **Superlectinas:** Lectinas que possuem pelo menos dois CRDs diferentes (como a TXCL-1)

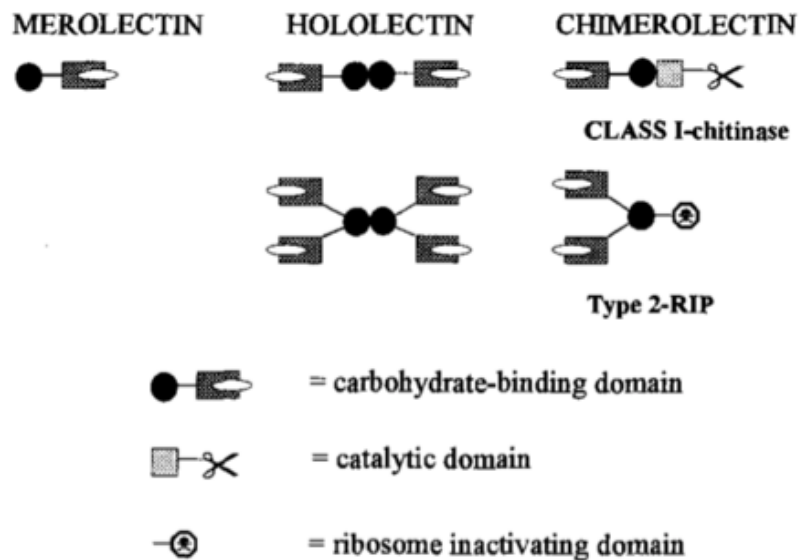


Figura 1.1 Estrutura de lectinas: Merolectinas, hololectinas e quimerolectinas.
(Extraído de Van Damme, 1998 (3))

1.2.2 Classificação de acordo com a especificidade ao hidrato de carbono

As lectinas de plantas podem ser também divididas de acordo com as suas diferentes **especificidades de ligação aos hidratos de carbono**. Podem se dividir em 6 grupos (5):

I- Manose/Glucose

II- Galactose/*N*-acetil-galactosamina

III- *N*-acetil-glucosamina

IV- L-fucose

V- Ácido siálico

VI- Oligossacáridos

As principais lectinas dos cinco primeiros grupos estão representados na figura 1.2.

lectin				
source	name/abbrev	preferred oligosaccharide ^b	RA ^c	
mannose ^d				
jackbean	concanavalinA/ConA	Man α 6(Man α 3)Man	130	
<i>Escherichia coli</i> ^e	type 1 fimbriae			
fava bean	favin			
<i>Galanthus nivalis</i> (snowdrop) ^e	GNL	Man α 6(Man α 3)Man		
<i>Lathyrus ochrus</i>	LOL	octasaccharide		
lentil	LCL			
rat serum	MBP-A ^f			
pea	PSL	fucose-containing hexasaccharide		
<i>N</i> -acetylglucosamine				
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSII			
wheat germ	WGA	(GlcNAc β 4) ₃	3000	
galactose/ <i>N</i> -acetylgalactosamine				
<i>Artocarpus integrifolia</i> (jackfruit)	jacalin	Gal β 3GalNAc		
<i>Dolichos biflorus</i> ^g	DBL	GalNAc α 3GalNAc	36 ^h	
<i>Erythrina corallodendron</i> (coral tree)	ECorL	Gal β 4GlcNAc	30–50 ⁱ	
<i>Helix pomatia</i> (snail) ^g				
lima bean ^g	LBA	GalNAc α 3(Fuca2)Gal	43 ^h	
<i>Moluccella laevis</i> ^g (bells of Ireland)	MLL			
peanut ^f	PNA	Gal β 3GalNAc	50 ⁱ	
ricin	RCA II			
soybean ^d	SBA			
fucose				
<i>Anguilla anguilla</i> (eel)				
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA			
<i>Ulex europeus</i>	UEA I	Fuca α 2Gal β 4GlcNAc β 6R	900	
sialic acid				
<i>Sambucus nigra</i> (elderberry)		NeuAc α 2,3Gal	30–80	
		NeuAc α 2,6Gal	1600	
<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe crab)		NeuAc α 2,6GalNAc	30	

Figura 1.2 Classificação das lectinas de acordo com a sua especificidade de ligação ao hidrato de carbono.

(Extraído de Fu, 2011 (5))

1.2.3 Classificação de acordo com a evolução genética

As lectinas de plantas podem ser também divididas em 12 famílias de acordo com a sua evolução genética (*Van Damme et al.* 2008) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificação das lectinas de acordo com a sua evolução genética.

(Adaptado de Van Damme, 2008 (13))

Family	Structure	Sugar-binding specificity	Representative lectin
<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin homologs Amaranthins	1Y2T (PDB)	Galactose	<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin (ABA)
Class V chitinase homologs with lectin activity		High-mannose N-glycans	Chitinase-related agglutinin (CRA)
Cyanovirin family	2JZJ (PDB)	Mannose	Cyanovirin-N (CV-N)
EEA family		Mannose/galactose	<i>Euonymus europaeus</i> agglutinin (EEA)
GNA family	3A0C (PDB)	Mannose/sialic acid	<i>Polygonatum cyrtonema</i> lectin (PCL)
Proteins with hevein domains	2UVO (PDB)	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	<i>Wheat germ agglutinin</i> (WGA)
Jacalins	3P8S (PDB)	Mannose	Jacalin (JAC)
Proteins with legume lectin domains LysM domain	3D4K (PDB)	D-mannose	Concanavalin A (ConA)
Nictaba family			<i>Cucurbitaceae phloem</i> lectin (CPL)
Ricin-B family	1 M2T (PDB)	Beta-galactose	European mistletoe lectin (ML-I)

1.3 Lectinas animais

Apesar das lectinas serem predominantes nas plantas e leguminosas, existem lectinas específicas nos animais. Estas lectinas estão resumidas no anexo A7.

As **lectinas do tipo C** são as lectinas que necessitam de cálcio para o reconhecimento celular. Os receptores desta família possuem todos domínios de reconhecimento de hidratos de carbono (CRDs) semelhantes. Existem 17 subgrupos, definidos pela sua estrutura e relação filogenética. São também classificadas como sendo receptores solúveis ou transmembranares (14). As selectinas são moléculas de adesão celular (CAMs) que apresentam propriedades semelhantes às lectinas do tipo C devido ao grupo amino terminal e à ligação dependente de cálcio aos hidratos de carbono. Incluem a L-selectina (em linfócitos), a E-selectina (nas células endoteliares) e a P-selectina (nas plaquetas e células endoteliais). O anexo **A2**. resume as características dos 17 subgrupos de lectinas do tipo C (15).

As **lectinas do tipo S** são um grupo de lectinas que necessitam de tióis livres para a sua estabilidade. São também conhecidas como galactinas. As galactinas tipicamente ligam glicoconjugados que contêm β -galactose. São a classe de lectinas mais expressa em todos os organismos (9).

As **lectinas do tipo I** pertencem à superfamília das imunoglobulinas (estas são capazes de discernir diferentes hidratos de carbono). Possuem um subgrupo, chamado Siglec (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*), de lectinas que se ligam especificamente ao **ácido siálico**. Existem 14 tipos diferentes de Siglecs mamíferas (9).

São várias as moléculas alvo que ligam-se a lectinas endógenas, como por exemplo: a galactose, manose, fucose, ácido siálico, *N*-acetilgalactosamina, lactose, sialilo Lewis^x, *N*-acetil-lactosamina, pullulano, hialuronano, arabinogalactana, dextrano, quitosano (8).

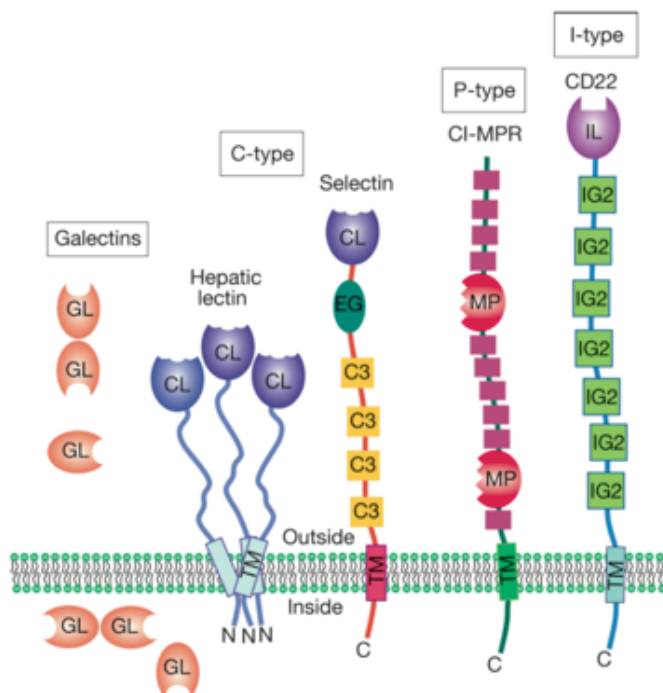


Figura 1.3 O domínio extracelular de ligação ao hidrato de carbono (CRD) define a classificação da lectina. Os CRDs presentes na figura são: CL (*C-type lectin CRD*), GL (*S-type lectin CRD*), MP (*P-type lectin CRD*), IL (*I-type lectin CRD*). Os outros domínios nas estruturas das lectinas são a EG (*Epidermal Growth Factor-like domain*), IG2 (*immunoglobulin C2-set domain*), TM (região transmembrana), C3 (*complement regulatory repeat*). (Extraído de Videira, 2009 (9))

1.4 Aplicações das lectinas

As lectinas possuem muitas utilidades na medicina, biologia e agricultura. Têm atividade antibiótica, antiviral e são biomarcadores para diagnóstico clínico. As lectinas demonstram possuir atividade antitumoral e antiproliferativa através da morte celular programada: um mecanismo intrínseco celular que elimina células malignas do corpo e mantém a homeostasia, apoptose e autofagia (Figura A1. do anexo) (10). Já foi encontrada atividade anti-cancerígena em várias lectinas de plantas incluindo a WGA e a ricina. A lectina da *Polygonatum cyrtonema* (PCL) e a Concanavalina A (ConA) já foram demonstradas terem efeito autofágico nas células tumorais. As lectinas mostraram também elevado potencial em uso em sistemas de entrega de fármacos, como as nanopartículas (6).

1.5 Nanoformulações

A nanotecnologia é a ciência da síntese, manipulação e utilização das "máquinas" moleculares conhecidas como nanopartículas (16). A nanotecnologia possui aplicações no diagnóstico clínico, em formulações farmacêuticas, nutracêuticos e na produção de materiais biocompatíveis.

O desenvolvimento da tecnologia de nanopartículas (NPs) originou grandes avanços na farmacologia ao reduzirem os efeitos secundários de fármacos citotóxicos e ao melhorarem as suas seguranças, eficácias, $T_{1/2}$, solubilidades, farmacocinéticas e biodistribuição (17).

As nanopartículas possuem ótimas propriedades de superfície: têm entre 200 a 500 nm, sendo mais pequenas que as microesferas (30 a 200 μm) (18). A utilização de nanopartículas como veículos possui várias vantagens como a solubilização de moléculas hidrofóbicas, aumento do tempo de circulação no sangue, aumento da especificidade e afinidade do fármaco e libertação facilitada nas células-alvo. É possível controlar quase todos os parâmetros das nanopartículas como o seu tamanho, as suas geometrias, cargas de superfície, propriedades físicas, propriedades químicas, ligandos e potencial zeta, entre outros (19).

A biocompatibilidade do material da nanopartícula é muito importante pois tem que ser compatível com o corpo e ser facilmente degradada por ele. As nanopartículas utilizadas na terapia consistem em vários materiais biodegradáveis que podem ser à base de lípidos, polímeros naturais ou sintéticos, metais ou nanopartículas biológicas. Algumas das nanopartículas utilizadas são: nanoemulsões, micelas, lipossomas, polímeros biodegradáveis, estruturas de carbono, hidrogéis, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, neoestruturas metálicas, dendrímeros, entre outros (20,21). A tabela **A3**. dos anexos resume as categorias de nanoestruturas disponíveis para entrega de fármacos no corpo e a figura 1.4 esquematiza algumas delas.

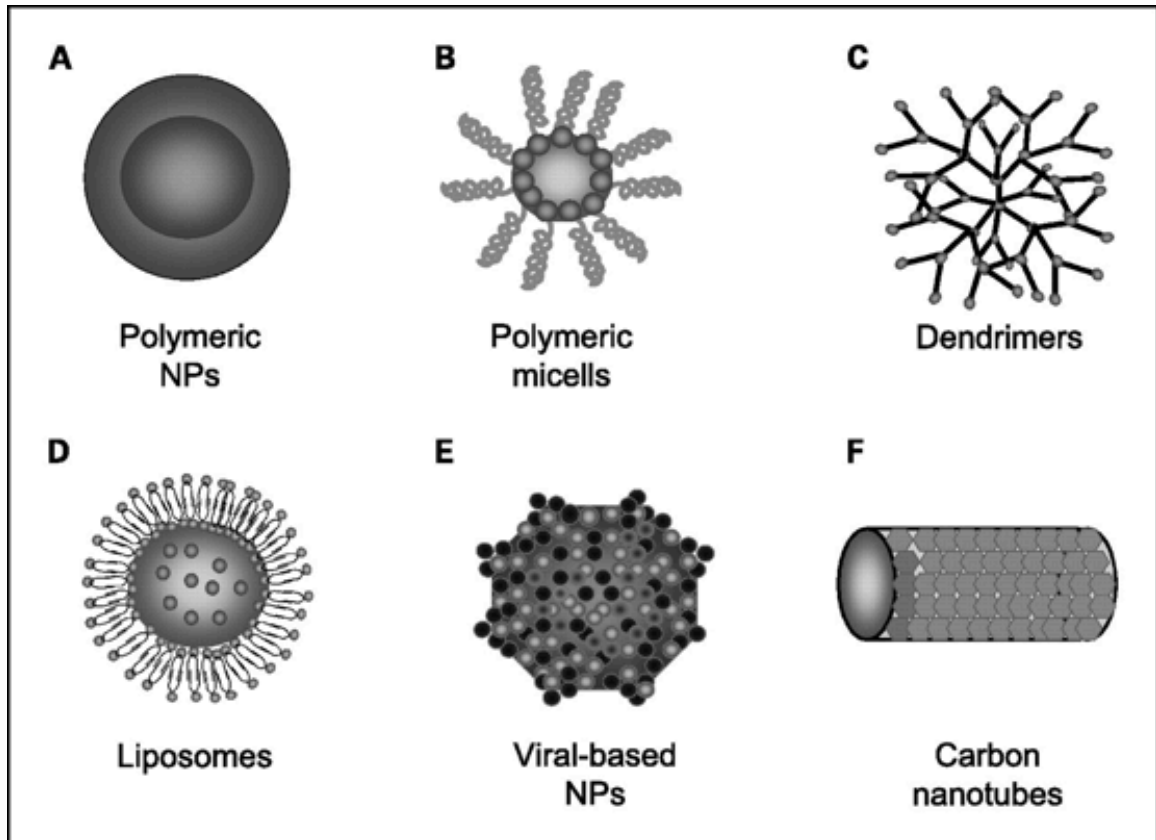


Figura 1.4 Alguns tipos de nanopartículas.

A) Nanopartículas poliméricas: Os fármacos estão conjugados ou encapsulados em polímeros. **B)** Micelas poliméricas: São anfipáticas. O núcleo hidrofóbico serve como reserva de fármacos hidrofóbicos. A camada externa hidrofílica estabiliza o núcleo e torna a matriz hidrossolúvel. **C)** Dendrímeros: Macromoléculas tridimensionais poliméricas sintéticas compostas de várias ramificações, de monómeros que irradiam do núcleo central **D)** Lipossomas: Compostos por uma camada bilipídica que protege uma solução aquosa no interior. **E)** Nanopartículas à base de Vírus: O interior destes vírus modificados pode encapsular e proteger compostos sensíveis, sendo passíveis de alterações exteriores também. **F)** Nanotubos de carbono: Cilindros de carbono C_{60} . Os nanotubos são insolúveis em todos os solventes, o que gera preocupações em relação à sua toxicidade. A funcionalização química dos nanotubos pode lhes conferir a capacidade de se dissolver em água e podem ser funcionalizados com ligandos e agentes terapêuticos. São aplicados como sensores para detecção de DNA e proteína, em diagnóstico e como matrizes de vacinas ou proteínas. (Extraído de Cho, 2008 (22))

A figura 1.5 demonstra o mecanismo de ação das nanopartículas. Após a degradação do vector, o fármaco é libertado. A entrada intracelular e a libertação prolongada do fármaco minimizam os efeitos secundários e permitem um tratamento da doença dirigido (23). No caso dos fármacos tóxicos, é bastante desejável desacelerar a libertação de modo a reduzir a toxicidade produzida (21).

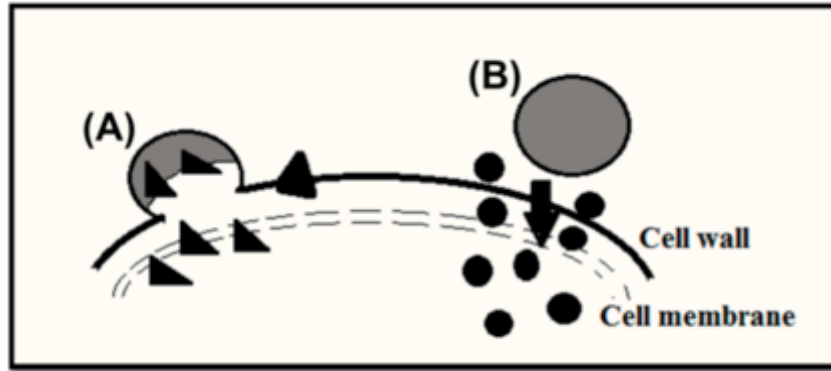


Figura 1.5 Mecanismo da entrega farmacológica das nanopartículas. A) A nanopartícula combina-se com a membrana celular por endocitose e liberta o fármaco dentro da célula. B) A nanopartícula adere à membrana celular e liberta prolongadamente as partículas do fármaco, que se vão distribuindo dentro do alvo.

(Extraído de Kaur, 2016 (24))

As nanopartículas permitem a entrega de moléculas pequenas, proteínas e ácidos nucleicos. Alguns fármacos que não passam nas primeiras fases de ensaios clínicos podem ser reformulados com nanopartículas, para tentarem melhorar as suas propriedades (23). Um bom *design* de nanopartículas permite a entrega do fármaco "*at the right place and right time*", em quantidade suficiente para desencadear uma resposta farmacológica (23). As nanopartículas devem idealmente ter uma superfície hidrofílica para conseguir iludar e evitar os macrófagos. Pode-se obter através de um revestimento com um polímero hidrofílico, o PEG (polietilenoglicol), que protege a nanopartícula de opsonização ao repelir as proteínas plasmáticas (22).

Cada classe de nanopartícula possui propriedades físicas e químicas diferentes (16). Segue-se a descrição em maior pormenor de algumas das nanopartículas com maior importância:

1.5.1 Nanopartículas poliméricas

As partículas poliméricas são dispersões de partículas ou partículas sólidas que têm um tamanho entre **10 a 1000 nm de diâmetro**, sendo o mais típico **200 nm**. Possuem várias propriedades desejáveis para uso como matriz de transporte de fármacos (21).

As nanopartículas poliméricas são altamente estáveis e podem ser sintetizadas com várias propriedades conforme os surfactantes e solventes orgânicos utilizados. São também importantes a escolha do tamanho dos polímeros e as dimensões dos monómeros utilizados. As escolhas na síntese vão afectar certas características como, por exemplo, o perfil de libertação do fármaco encapsulado e o seu potencial zeta. A libertação do fármaco pode ser retardada, prolongada ou desencadeada por fatores externos (*triggered*). As nanopartículas poliméricas podem também ser transformadas com grupos funcionais de acordo com as propriedades do fármaco ou da célula-alvo (21).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em dois tipos: Nanoesferas e nanocápsulas (figura 1.6).

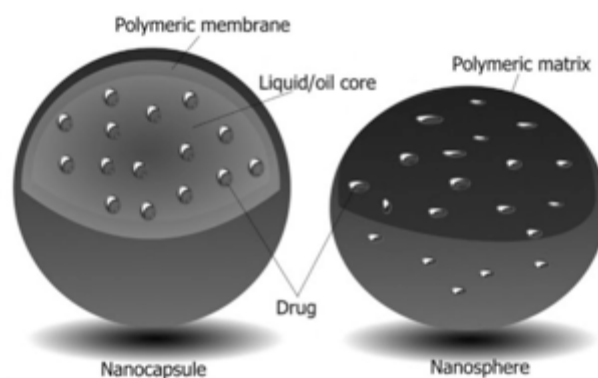


Figura 1.6 Esquema dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: Nanocápsulas e nanoesferas. (Extraído de Andronescu, 2017 (21))

As nanoesferas são uma matriz densa onde o fármaco está disperso homogeneamente e é libertado por difusão. As nanocápsulas são vesículas poliméricas ocas onde o fármaco reside no interior (25). A vantagem das nanocápsulas em relação às nanoesferas prende-se por estas poderem incorporar fármacos sólidos, líquidos e ainda dispersões moleculares. O baixo conteúdo polimérico das nanocápsulas reduz a potencialidade de toxicidade após a degradação. A capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos é também superior, devido ao seu núcleo lipofílico. As nanocápsulas são mais estáveis que os lipossomas, permitindo encapsular fármacos de várias naturezas químicas e libertá-los em vários ambientes sujeitos a mudanças de temperatura e pH (17,23).

Os polímeros biodegradáveis apresentam uma boa eficiência de encapsulação, conjugação ou adsorção de fármacos (Figura 1.7). Alguns exemplos de **polímeros naturais** são o alginato, dextrano e o quitosano. Os **polímeros sintéticos** mais utilizados são por exemplo o **HPMA** (*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide), **PLA** (ácido polilático), **PLGA** (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)), **PEG-PLA** (Poli(etilenoglicol)-ácido polilático). O **PLGA** é um co-polímero do **PLA** e **PGA** (poli(ácido glicólico)), sendo o biomaterial mais bem definido em relação ao seu design e desempenho (21).



Figura 1.7 Encapsulação, conjugação e adsorção de um antígeno à superfície das nanopartículas poliméricas. Em vez do antígeno, pode estar ligado outro tipo de ligando, como as lectinas. (Extraído de Andronescu, 2017 (21))

Os polímeros naturais apresentam uma libertação mais rápida, enquanto que os sintéticos possuem uma libertação mais prolongada: Têm uma degradação mais lenta no corpo que pode ir desde dias até semanas (26). O fármaco pode ser libertado com um perfil cinético semelhante à de ordem zero, que estabelece um fluxo contínuo de fármaco para fora da nanopartícula. Os fármacos orais geralmente apresentam perfis de libertação de primeira ordem onde a libertação do fármaco é proporcional à quantidade ainda disponível na matriz (26).

As desvantagens das partículas poliméricas são principalmente a presença de resíduos de solventes orgânicos após a sua preparação, a produção de monómeros tóxicos, pouca capacidade de encapsulação e uma solubilidade aquosa por vezes limitada (21).

1.5.2 Lipossomas

Os sistemas de lipossomas são os mais estudados e foram os primeiros *nanocarriers* aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em humanos (17,20). São vesículas pequenas que são compostas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, com tamanhos entre os **80 e 300 nm de diâmetro**. Têm uma fase interna aquosa que permite a encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (17). Podem ser encapsulados fármacos dentro da camada fosfolipídica, na fase interna aquosa ou na interface da bicamada (figura 1.8). A fosfatidilcolina, o colesterol e o PEG são os lípidos mais utilizados na preparação dos lipossomas (27).

Podem ser classificados conforme a sua composição ou mecanismo de ação: Lipossomas convencionais, lipossomas sensíveis a pH, lipossomas catiónicos, imunolipossomas, *etc.* Os lipossomas apresentam uma elevada absorção no lúmen intestinal até às placas de Peyer, por via das células M e dos enterócitos (28). Muitos dos parâmetros dos lipossomas, como por exemplo o tamanho da vesícula, estrutura da bi camada e carga, podem afetar a resposta imune que irá ser desencadeada (29). Os lipossomas possuem uma boa absorção gástrica, mas têm má estabilidade gastrointestinal, baixa reprodutibilidade entre lotes e baixa capacidade de encapsulação (30).

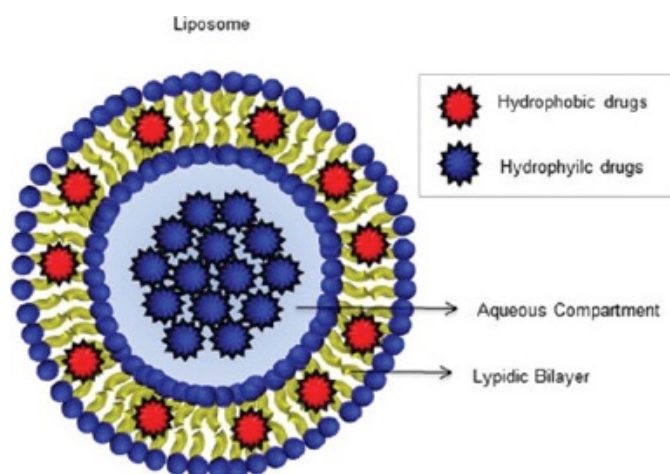


Figura 1.8 Lipossoma como sistema de entrega de fármacos. Podem estar encapsulados moléculas hidrofílicas no interior ou moléculas hidrofóbicas na interface da bicamada fosfolipídica. (Extraído de Cordon, 2013 (31))

1.5.3 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (*Solid Lipid Nanoparticles/SLN*) são uma alternativa às nanopartículas poliméricas. São *carriers* coloidais constituídos por lípidos que são sólidos à temperatura ambiente. Possuem entre **50 a 1000 nm de diâmetro** e são estáveis, biodegradáveis, altamente toleradas pelo corpo, com elevada biodisponibilidade e têm um tempo de circulação sanguínea prolongado. As **SLNs** são muito fáceis de produzir em grande escala e podem ser administradas por várias vias como a parental, oral, dermatológica, ocular, pulmonar e rectal (30,32). Possuem a capacidade de atravessar a **barreira hematoencefálica** e estão a ser investigados para administração de fármacos que não conseguem passar esta barreira (30).

1.5.4 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas são maioritariamente constituídas por metais nobres como o ouro, prata, platina, ou então por óxidos metálicos como o óxido de ferro, óxido de níquel e óxido de cobalto (33). Têm entre **10 a 500 nm de diâmetro** e os fármacos podem ser ligados ou embebidos dentro das nanopartículas metálicas. A desvantagem destas nanopartículas é poderem ocorrer interações entre o fármaco e a nanopartícula metálica, como por exemplo interações lipofílicas ou atrações electrostáticas (34).

1.5.5 Nanopartículas à base de sílica

As nanopartículas à base de sílica têm elevadas áreas de superfície, biocompatibilidade, não apresentam toxicidade e possuem alta estabilidade a pH gástrico. Conseguem encapsular uma grande quantidade de fármaco no seu interior e têm entre **10 a 300 nm de diâmetro**. São insolúveis e apresentam uma libertação lenta do fármaco (21).

1.5.6 Micelas poliméricas

As micelas poliméricas são partículas de coloides que têm um núcleo hidrofóbico e um exterior hidrofílico solúvel em água. Permitem encapsular os fármacos no núcleo ou no exterior por ligação covalente. Possuem menos de **50 nm de diâmetro**, são termoestáveis, biocompatíveis e apresentam elevada estabilidade no sangue. São úteis para libertação prolongada de fármacos com má solubilidade aquosa ou então para imagiologia (30).

1.5.7 Dendrímeros

Os dendrímeros são uma classe de macromoléculas poliméricas que têm entre **10 a 100 nm de diâmetro** e são sintetizadas por uma série de polimerizações controladas. A estrutura destes polímeros é repetida em ramificações à volta de um núcleo, criando um padrão geométrico 3-D. Com as sucessivas camadas poliméricas, os dendrímeros ficam semelhantes a esferas, havendo no entanto cavidades onde estão inseridos os fármacos. Ao mesmo tempo, as ramificações permitem a conjugação com vários ligandos diferentes para uma resposta mais específica ao alvo celular (21).

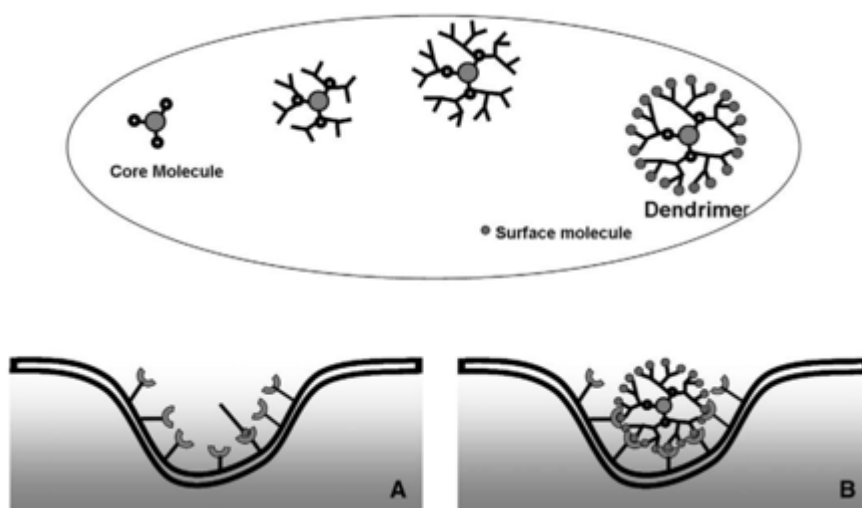


Figura 1.9 Mecanismo de ação dos dendrímeros. A) As moléculas pequenas têm a habilidade de interagir com apenas um receptor num sistema biológico. B) Os dendrímeros conseguem interagir com múltiplos receptores simultaneamente, havendo potencial para aumentar o efeito biológico. O dendrímero é fabricado a partir de um núcleo (*core molecule*) revestida por ramos sintetizados por polimerizações.

(Extraído de Bawarski, 2008 (30))

1.5.8 *Quantum dots*

Os *quantum dots* (QDs) são nanocristais semicondutores coloidais que vão desde **2 até 10 nm de diâmetro**. São os vectores mais pequenos para transporte de fármacos. No entanto, o tamanho pequeno dos QDs poderá impedir acomodar moléculas maiores no interior. Os QDs podem ser sintetizados a partir de vários tipos de materiais semicondutores por síntese coloidal ou eletroquímica. Os materiais mais utilizados são o CdSe, CdTe, InP e InAs. Estas partículas podem absorver luz branca e reemiti-la com diferentes energias conforme o tamanho do *quantum dot*, para posterior detecção.

Por exemplo, QDs com 2 nm emitem luz verde, enquanto que QDs com 5 nm emitem luz vermelha. Podem se realizar bibliotecas de QDs com partículas de vários tamanhos e composições para as mais variadas aplicações em estudos e diagnósticos. No entanto, em certas condições os QDs podem tornar-se citotóxicos. Por exemplo, ocorre libertação de cádmio pelas partículas de CdSe após uma exposição crónica a luz UV (30).

1.6 *Enhanced permeation and retention effect*

O aumento da quantidade de matrizes de nanopartículas disponíveis e das suas modificações "à medida" está a levar a uma revolução nas áreas da oncologia e farmacocinética (16). No tratamento do cancro já existem várias nanoformulações aprovadas para uso clínico em quimioterapia (19). Várias nanopartículas de diversas formas, tamanhos e naturezas químicas, mostraram elevada eficácia em encapsular diferentes tipos de fármacos anticancerígenos como siRNA (*short interfering RNA*), antibióticos e agentes quimioterapêuticos. Estas nanopartículas de primeira geração atingem o tecido tumoral passivamente, ao aproveitarem a permeabilidade aumentada que possuem, havendo um efeito de retenção na extravasação e acumulação nas células cancerígenas (17). Esta permeabilidade aumentada, também chamada de *enhanced permeation and retention effect* (EPR), acontece por causa das grandes fendas presentes nos vasos angiogénicos do tumor.

Para obterem um suprimento de nutrientes, os tumores sinalizam o endotélio através de VEGFs (Fator de crescimento endotelial vascular). O endotélio possui o VEGF I, que responde aos sinais da VEGF tumoral ao desenvolver novos vasos e capilares até ao tumor para este ter uma reserva de nutrientes, para se alimentar e se desenvolver (33). O desequilíbrio entre os reguladores da angiogénese, como os fatores de crescimento e as metaloproteínases de matriz (que promovem a degradação da matriz extracelular), fazem com que a vasculatura tumoral seja estruturalmente deficiente e possua fendas e poros entre as células endoteliais. As junções gap também ficam aumentadas e a drenagem linfática é comprometida (22). Ao mesmo tempo, existe uma diferença de pressão intersticial que leva para dentro as nanopartículas (Figura 1.10).

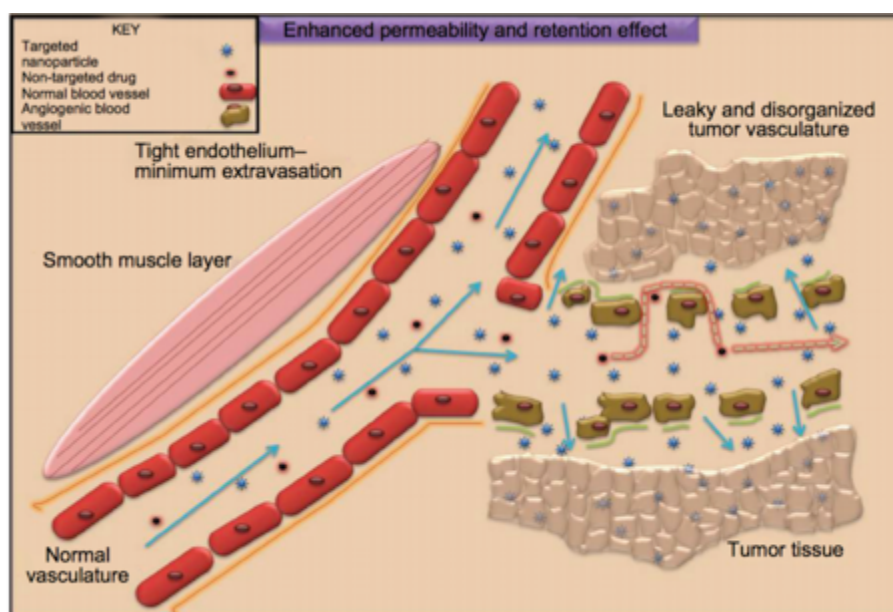


Figura 1.10 O efeito de *enhanced permeability and retention* em meio tumoral. Ocorre acumulação de nanopartículas nas células cancerígenas através do extravasamento nos vasos sanguíneos do tumor, que possuem fendas grandes de **200 a 1000 nm**. O tempo de retenção dos fármacos em nanopartículas é 10 vezes superior ao fármaco livre. (Extraído de Ranganathan, 2012 (35))

As nanopartículas chegam até aos tumores através das fendas e poros entre as células endoteliais, ficando depois lá retidos. Os fármacos normais não são retidos na zona tumoral e voltam à circulação sistémica, sendo depois metabolizados pelo fígado (35). A ausência de canais linfáticos normais nas células tumorais impede a *clearance*

normal das nanopartículas do tecido, aumentando a disponibilidade das nanopartículas nos tecidos malignos (36).

Como o tumor está sempre a crescer **descontroladamente**, necessitando cada vez de mais nutrientes, é possível atingi-lo passivamente ao misturar as nanopartículas com glucose, que vão ser mais captadas pelo tumor (33).

1.7 Mecanismo ativo e passivo das nanopartículas

O mecanismo visto anteriormente é o mecanismo passivo das nanopartículas. Mas, as nanopartículas podem atingir o seu sítio de ação por duas maneiras: ativamente ou passivamente (Figura 1.11) (21).

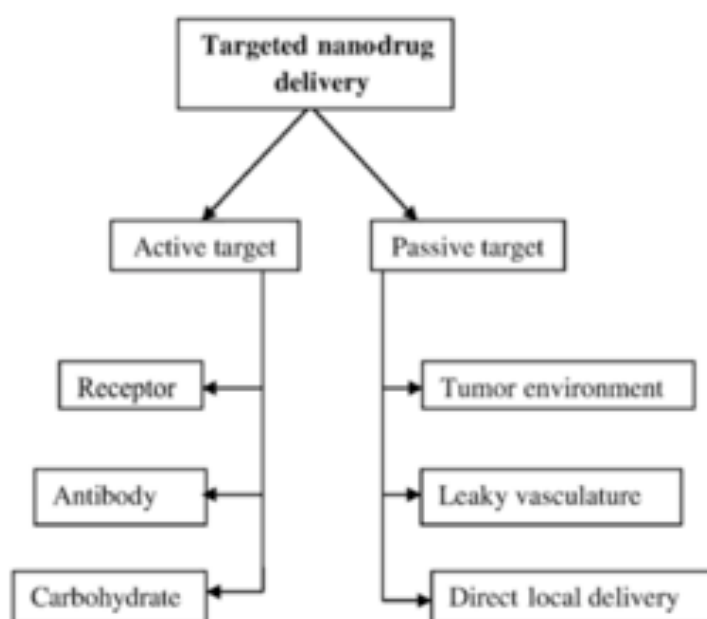


Figura 1.11 Mecanismo ativo e passivo das nanopartículas. Destacam-se com especial importância os hidratos de carbono e receptores (alguns dos quais lectinas) como possíveis alvos. (Extraído de Grumezescu, 2017 (21))

A primeira geração de nanopartículas apenas atuava com o mecanismo passivo para aumentar a eficácia dos fármacos livres. No entanto, podiam causar efeitos

secundários sistémicos graves. O mecanismo de acção passivo (*passive targeting*) depende das características físico-químicas dos vectores utilizados, para causar acumulação seletiva nas células-alvo e exclusão do resto dos tecidos. Por vezes, ocorre apenas um simples extravasamento devido à permeabilidade aumentada nos tecidos malignos (37).

A eficácia passiva vai depender muito do tamanho e da forma das nanopartículas. O tamanho afeta o movimento para dentro e fora da vasculatura, a forma vai influenciar a marginação da partícula ao endotélio (37).

No entanto, o tecido saudável continua a ser exposto aos efeitos do fármaco, as partículas podem acumular em outras zonas do corpo que não nos tecidos-alvo e são necessárias doses elevadas para atingir o efeito desejado. Estas restrições reduzem a dose tolerável e a efetividade da terapia das NPs incorporadas com agentes quimioterapêuticos (27).

Recentemente, os investigadores encontraram maneiras de implementar ligandos específicos nas superfícies das nanopartículas, de modo a obter-se uma formulação com entrega ativa.

Uma matriz de transporte com mecanismo de ação ativo (*active targeting*) utiliza um ligando que é reconhecido por um receptor na célula-alvo. A ligação ao receptor irá depois provocar a sua endocitose e acumulação intracelular. O mecanismo ativo é mais específico e seletivo que o passivo mas normalmente tem menor capacidade interna de fármaco (14). O ligando pode ser acrescentado através de um espaçador, como por exemplo o PEG, ou diretamente na superfície celular.

O *active targeting* permite a fabricação de nanopartículas para o tratamento e detecção de doenças que não possuem o efeito de **EPR** que é observada no cancro e na inflamação. Como resultado, este tipo de nanoformulações estão neste momento em investigação clínica para muitos tipos de patologias (20,21). Por exemplo, se as células-alvo são macrófagos ou células fagocitárias, os melhores ligandos são hidratos de carbono porque interagem com receptores à superfície celular que são lectinas (21).

1.8 Aplicações das nanopartículas

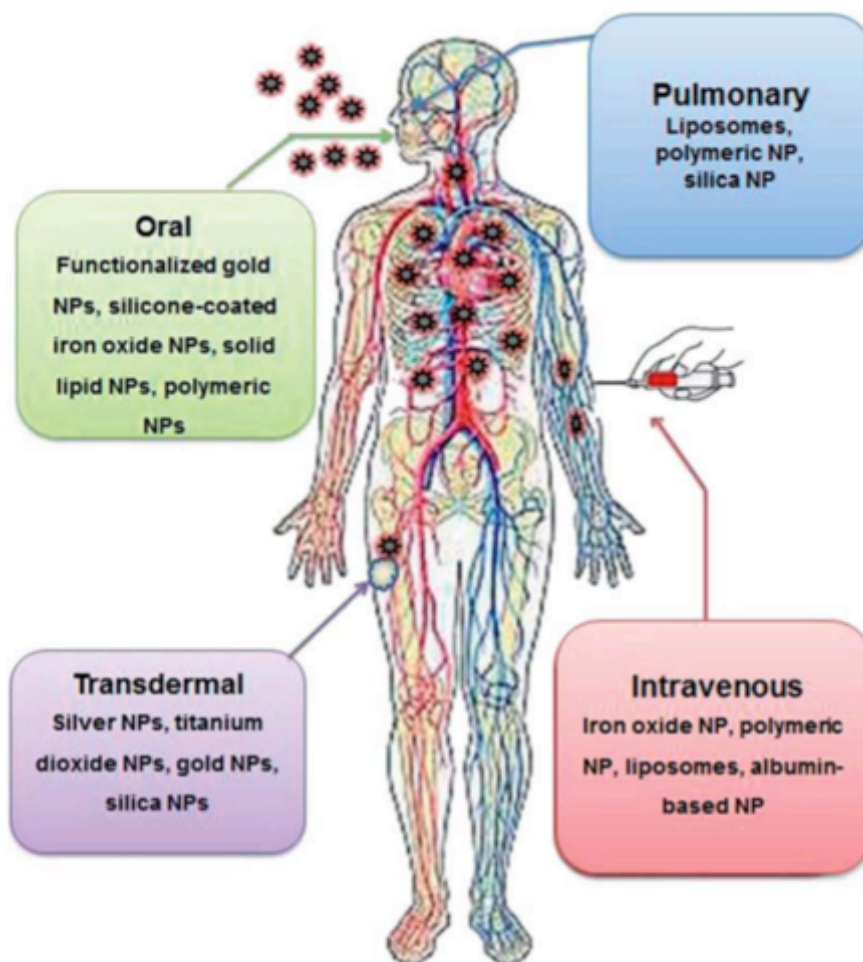


Figura 1.12 Vias de administração mais comuns de algumas nanopartículas.

(Extraído de Kumar, 2013 (36))

A figura 1.12 mostra-nos as vias de administração mais comuns de algumas nanopartículas. Para além da terapia, as nanopartículas podem também ser usadas para facilitar o diagnóstico precoce e monitorização da eficácia da terapêutica (17).

O design das nanopartículas pode incorporar agentes de contraste diferentes (radioativos, superparamagnéticos, fluorescentes) e aumentar as suas especificidades para o tecido, tal como a sua clearance e distribuição extracelular. Isto irá aumentar a sua sensibilidade e especificidade (17).

2 Métodos de pesquisa

Para esta monografia, foram realizadas várias pesquisas com os motores de busca Google Scholar, Science Direct, PubMed e Mendeley. A pesquisa foi realizada no mês de Agosto de 2017 e foram utilizadas as seguintes palavras-chave: "Lectin nanoparticles", "Lectin nano", "Lectin history", "Nanoparticle history", "Lectin nanoparticles cancer", "Lectin nanoparticles Insulin", "Lectin nanoparticles diagnostic", "Lectin nanoparticles treatment".

Para a pesquisa bibliográfica, foram escolhidos os artigos mais relevantes, tendo sido dada prioridade a artigos publicados de 2014 até à atualidade, e, posteriormente, artigos de 2004-2014. Alguns artigos mais antigos foram utilizados por razões históricas ou por apresentarem a primeira fonte e descoberta de informações pertinentes para a monografia.

3 Nanoformulações conjugadas

3.1 História do conceito de "bala mágica"

Em 1900, Paul Ehrlich, após ter assistido à opera "*Der Freischütz*", teve a ideia de uma "bala mágica" como sendo o sistema de entrega farmacológico ideal. Nesta obra, uma das personagens tem acesso a uma pistola com balas encantadas que acertam sempre sem falhar. Ele visionou que ao dirigir o tratamento para o seu alvo preferencial, seria possível matar bactérias sem prejudicar o resto do corpo. Uma "bala mágica" reconheceria especificamente o tecido afectado, libertando o fármaco no local preferencial de ação, com semelhança a um míssil guiado (38).

3.2 Nanopartículas dirigidas

A conjugação de ligandos como os anticorpos, fragmentos de anticorpos, péptidos, lectinas e outras pequenas moléculas à superfície de nanopartículas originaram uma nova geração de nanopartículas com aumento de especificidade *in vivo* (Figura 3.1). As nanopartículas "dirigidas" são aquelas que contêm ligandos à sua superfície que são capazes de reconhecimento celular específico. A incorporação destes ligandos é geralmente obtida por modificação durante a síntese da nanopartícula ou por ligação química entre ligandos e polímeros antes da sua síntese (17).

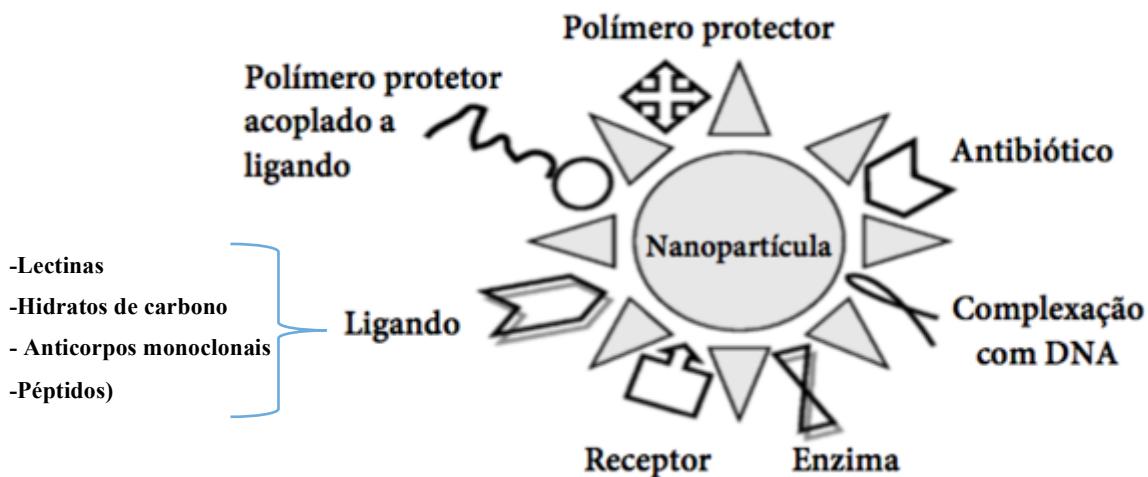


Figura 3.5 Conjugações possíveis nas nanopartículas. As nanopartículas podem ser conjugadas na superfície com diferentes moléculas: Receptores, enzimas, fármacos (antibiótico), polímeros protectores e ligandos. Na categoria dos ligandos, podemos utilizar lectinas, hidratos de carbono, anticorpos monoclonais e péptidos para aumentar a especificidade da ligação da nanopartícula. (Adaptado de Grumezescu, 2017 (2))

No Processo tumoral, os tumores expressam ou sobre-expressam alguns biomarcadores que são usados como alvos para entrega do sistema nanopartícula-fármaco (Figura 3.2) (17). A escolha do ligando a usar na nanoformulação deverá ser conforme a afinidade para a proteína receptora e o nível de expressão na célula-alvo (8).

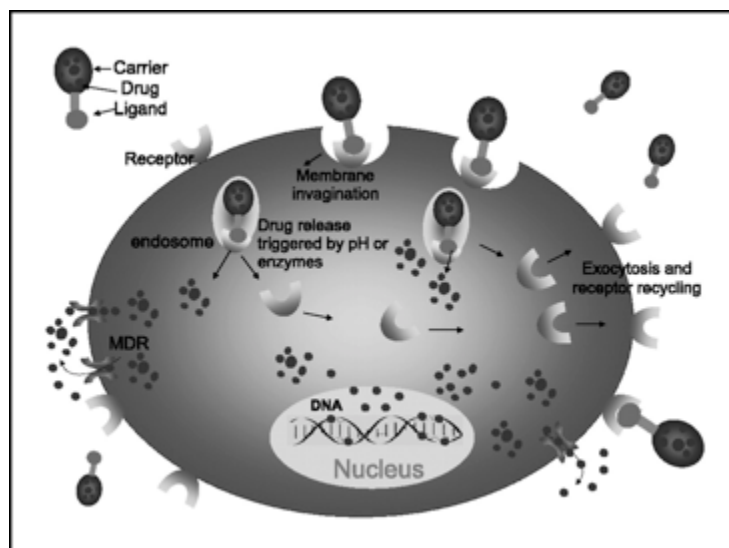


Figura 3.6 Internalização de nanopartículas via endocitose mediada por ligação ao receptor membranas em uma célula tumoral. A ligação dos ligandos ao receptor desencadeia a internalização através de endossomas. A libertação do fármaco para o citoplasma ocorre após degradação da nanopartícula pelo pH ácido ou enzimas. (Extraído de Kawangjae, 2015 (39))

3.2.1 Nanopartículas com interação lectina-hidrato de carbono

Existem dois tipos de nanopartículas dirigidas que usufruem da interação entre lectinas e hidratos de carbono:

- 1) Nanopartículas com hidratos de carbono à superfície, também chamadas de gliconanopartículas. São formuladas para atingirem lectinas expressas na superfície da célula-alvo (*direct lectin targeting ou glycotargeting*) (39,40).
- 2) Nanopartículas com lectinas à superfície para atingirem hidratos de carbono na superfície da célula-alvo (*reverse lectin targeting*) (39,40).

3.2.1.1 *Direct lectin targeting*

As lectinas são encontradas à superfície de certos tipos de células como receptores de hidratos de carbono. Estas lectinas receptoras são altamente expressas nos macrófagos alveolares, células de Kupffer, macrófagos do baço, macrófagos do cérebro e macrófagos do peritoneu (14).

Por exemplo, existem os receptores manose-6-fosfato (lectinas) à superfície das células hepáticas, que apesar de terem as suas funções no sistema hepático, podem ser utilizadas como alvos pelos hidratos de carbono ligandos das nanopartículas (41). Os hidratos de carbono são bons para conjugação a nanopartículas porque possuem baixo peso molecular, alta disponibilidade, alta biocompatibilidade e facilidade de produção.

3.2.1.2 *Reverse lectin targeting*

Todas as células exibem um glicoma próprio. Uma célula poderá também expressar glicanos anormais quando em estado patológico. Os glicanos à superfície das células são sítios de ligação para as lectinas, que têm alta afinidade para resíduos de hidratos de carbonos. Estes resíduos permitem a internalização das nanopartículas, na célula, após a adesão das lectinas (40,41). A combinação de um pequeno número

de glicanos pode produzir um grande número de estruturas químicas, as quais são reconhecidas especificamente pelas lectinas (41).

Na síntese destas matrizes, a associação entre as lectinas e as nanopartículas é feita por adsorção ou por ligação covalente, se esta não afectar a atividade e especificidade da lectina (40). Exemplificando com a lectina do trigo, a *Wheat germ agglutinin* (WGA), a modificação da superfície de nanopartículas com um revestimento de WGA, é possível aumentar a sua mucoadesão, induzindo uma semi-vida de fármaco mais prolongada. Um revestimento de lectinas permite também o reconhecimento de hidratos de carbono da parede bacteriana, à semelhança de alguns microrganismos, como as bactérias, que usam adesinas de superfície que têm a capacidade de ligação a certos hidratos de carbono (23,42).

3.3 Administração oral de nanopartículas

A via oral de administração tem muitas vantagens, como por exemplo a sua facilidade de administração, conveniência, conforto e baixo custo de produção. Existem no entanto muitos fármacos que não podem ser administrados por esta via por diversas razões. No entanto, a incorporação a nanopartículas poderá melhorar as suas propriedades (23). Este tópico irá abordar como é realizada a absorção de nanopartículas no trato gastrointestinal, referindo os fatores que afectam a sua absorção.

Existe um grande número de fármacos que, administrados livremente via oral, são degradados. Podem ser degradados pelo suco gástrico, enzimas gástricas ou hidrolases. Além do mais, as células epiteliais intestinais formam uma barreira com junções de oclusão e são protegidas por muco, impedindo a absorção e restringindo o acesso do fármaco à circulação sistémica (19). A absorção de um fármaco depende da fisiologia do trato gastrointestinal, da sua solubilidade, tipo de formulação, forma química, pKA, tamanho, hidrofobicidade, peso molecular, constante de ionização e das barreiras biológicas que restringem a absorção (23).

Existem três modos de atravessar o epitélio intestinal: A via transcelular, a via linfática e a via paracelular (Figura 3.3) (43).

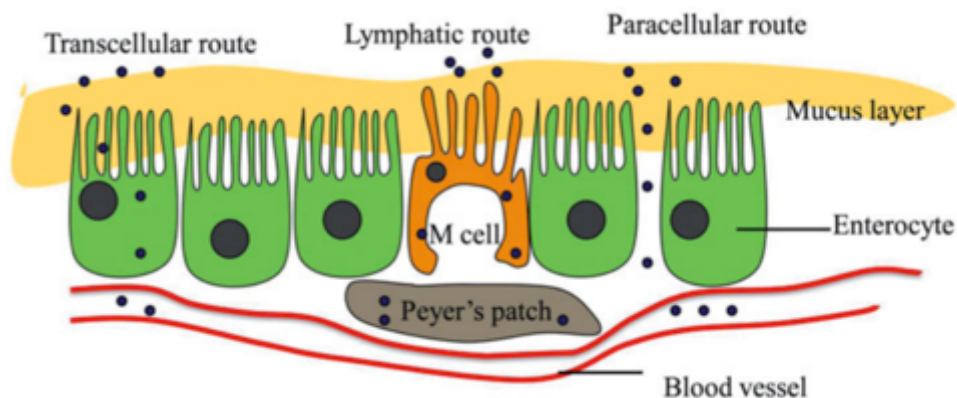


Figura 3.7 As vias para absorção no epitélio intestinal (membrana mucosa).
(Extraído de Luo,2015 (43))

As células M e os enterócitos são as principais células intestinais de transporte, sendo que os enterócitos representam a maioria das células do tracto gastrointestinal (44).

Utilizando as nanopartículas, a absorção gastrointestinal irá ocorrer em sítios diferentes consoante o tamanho da partícula. Partículas com menos de **10 μm** de diâmetro são transportadas pelas placas de Peyer via transcelular e paracelular. As nanopartículas que têm menos de **200 nm** são absorvidas por endocitose pelos enterócitos (via transcelular) (45). Quando as nanopartículas aderem à camada de muco, aumentam a possibilidade de migração transcelular nas camadas inferiores do epitélio gastrointestinal (21). As células M têm uma grande capacidade de endocitose e transcitose e são capazes de transportar as nanopartículas. Estas células vão também ajudar no transporte através das placas de Peyer (21). O efluxo por transportadores como a P-glicoproteína e várias enzimas também afecta a biodisponibilidade dos fármacos (45).

No entanto, certas propriedades da membrana mucosa intestinal vão permitir melhorar a absorção das nanopartículas ao as **conjugar às lectinas**. Irá agora ser abordado as principais características da membrana mucosa intestinal, das células M e os **sistemas bioadesivos**: Sistemas de transporte de fármacos que possuem mucoadesão.

3.3.1 Membrana mucosa intestinal

A superfície celular da mucosa intestinal é formada por microvilosidades (Figura 3.3). Elas expressam hidratos de carbono à sua superfície que têm enzimas

adsorvidas e criam um ambiente muito hostil. As vilosidades possuem uma população muito dinâmica de células epiteliais que são substituídas cada 3 a 5 dias (46). Na mucosa intestinal existem células responsáveis por absorção, secreção e células endócrinas (46).

A mucosa intestinal é protegida das condições acídicas, ataques biológicos e químicos por camadas de um gel de muco. É uma barreira protetora seletiva que permite a troca de nutrientes, água e moléculas pequenas. Ao mesmo tempo, é impermeável a patógenos, é carregada negativamente (devido à presença de ácido siálico e ácido sulfônico), é renovada continuamente e é um lubrificante natural (23,43). Apresenta uma gama de pH muito vasta, que vai desde 1-2 no estômago até 7-8 no cólon (46). O gel de muco possui também uma função de "isco", pois apresenta algumas das funcionalidades da membrana mucosa, o que atrai a si os patógenos (4).

O muco é sintetizado por células caliciformes localizadas no epitélio colunar que secretam glóbulos de muco. Todos os órgãos expostos ao ambiente externo secretam muco. Incluem por exemplo o trato respiratório, gastrointestinal, reprodutor e ocular (4). Os principais componentes do muco são as mucinas, que quando dissolvidas em água, formam um gel por ligações reticulares. As mucinas são glicoproteínas codificadas pelo gene MUC e são altamente glicosiladas, apresentando um conteúdo em hidratos de carbono de 70 a 80% (47). São eles a *N*-acetil-D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina, **fucose**, galactose, **ácido siálico** e, em menor extensão, a manose (47). Devido ao seu elevado conteúdo em glicanos, têm a capacidade de reter água, manter a hidratação do epitélio e apresentam resistência à proteólise. As mucinas também podem estar ligadas à membrana do epitélio mucoso e não serem secretadas (47). Os tipos de mucina encontradas ao longo do trato gastrointestinal são a MUC6, MU5AC e a MUC2 (48). As glicosilações das membranas mucosas e as mucinas são potenciais alvos das lectinas conjugadas a NPs.

3.3.2 Células M

As células M (Figura 3.3) são células epiteliais especializadas e localizadas no epitélio folicular das placas de Peyer ou do tecido linfático associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue* ou GALT). Fazem parte do sistema imune da mucosa e desempenham um processo crucial no processamento de bactérias, vírus e antígenos. Por isso, o *targeting* dos receptores das células M envolvidos nas

interações hospede/patógeno e no processamento de antígenos, pode ser útil para aumentar a ligação e absorção das nanopartículas por transcitose (4). As células M apresentam *pattern recognition receptors* (PRRs), ou seja, receptores que detectam moléculas típicas presentes nos patógenos. São alguns deles os *Toll-like receptors* (TLRs), **lectinas tipo C**, receptores integrina $\alpha 5\beta 1$ e *NOD-like receptors* (4).

As células M possuem menos atividade hidrolítica comparadas às células epiteliais normais. Isto pode incentivar o seu uso como alvos por parte das nanopartículas conjugadas. No entanto, as células M representam apenas 1% do trato gastrointestinal, não havendo ainda um grande impacto na absorção oral de NPs (49).

As lectinas são talvez os ligandos mais estudados para aumentar as interações com as células M (Tabela 3.1) (4). Os glicanos das células M contêm *N*-acetil-galactosamina, *N*-acetil-glucosamina, galactose, **fuose** e **ácido siálico** (41). Os conjugados com lectinas poderão ser de interesse para atingir vários tipos de células dentro da mucosa intestinal como as células epiteliais, células cancerígenas, as placas de Peyer ou o GALT (42). A maior parte destas células possuem proteínas e lípidos à superfície que são glicosilados e se ligam às lectinas (50).

Tabela 3.1 Algumas lectinas que já foram utilizadas para ligação às células M (4).

<u>Lectina</u>	<u>Ligação</u>	<u>Características</u>
<i>Wheat germ agglutinin</i> (WGA)	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina e ácido siálico	Altamente resistentes a pepsinas, tripsinas, pancreatina e elastase sem perder características funcionais de ligação à célula
Lectina do tomate (TL)	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina	
<i>Ulex Europaeus 1</i> (UEA-1)	L- α -fuose	Ligação à superfície apical das células M de ratos. Possuem uma ligeira imunogenicidade
<i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	L- α -fuose	
Concanavalina A (ConA)	α -D-manose, α -D-glucose	Efeito autofágico nas células tumorais

3.3.3 Sistemas de transporte Bioadesivos

Os sistemas bioadesivos são **polímeros** que são conjugados com fármacos e que aderem à mucosa epitelial. A sua função é de aumentar e prolongar o contacto dos fármacos na zona apical da mucosa epitelial, onde ocorre a absorção. Os sistemas bioadesivos são conjugados aos fármacos para melhorarem as suas absorções intestinais e biodisponibilidade oral (32,51).

Os **polímeros** podem ser bioadesivos devido à sua viscosidade, interações eletrostáticas não específicas e não covalentes, e por ligação a um receptor específico (47). Um polímero ao interagir com a mucosa é denominado de mucoadesivo e ao ligar diretamente à membrana celular da mucosa é denominado de citoadesivo, induzindo transporte ativo por vesículas da membrana (51).

3.3.3.1 Mucoadesivos de primeira geração

Os **polímeros mucoadesivos** de primeira geração, também chamados de mucoadesivos não-específicos, podem ser sintéticos ou naturais. São geralmente hidrofílicos, com grupos funcionais que permitem ligações de hidrogénio e interações electrostáticas. Nesta categoria inserem-se as **nanopartículas**, pois possuem elevadas áreas de superfície e apresentam assim uma elevada interação com as superfícies da membrana. No entanto, a duração máxima da adesão às mucosas é limitada pelo tempo de renovação da camada de gel de muco (47).

3.3.3.2 Mucoadesivos de segunda geração

Os mucoadesivos de segunda geração são **polímeros** que foram desenvolvidos para criar interações específicas e atravessar barreiras biológicas. As **nanopartículas** podem ser revestidas por ligandos citoadesivos, e assim, ligarem-se às superfícies epiteliais através de interações específicas mediadas por receptores (47). As **lectinas** são classificadas como bioadesivos de segunda geração por apresentarem uma

especificidade elevada para os resíduos de glicoproteínas presentes na superfície de células epiteliais (51). A ligação das lectinas é feita diretamente ao glicocálice das células intestinais epiteliais em vez do muco. Por isso, não são afetadas pela renovação (*turn-over*) da camada de gel de muco nem pelo efluxo (Figura 3.4) (14,19).

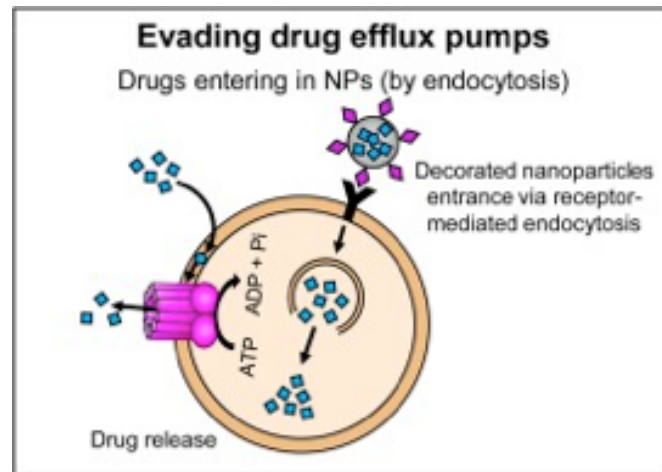


Figura 3.8 Evasão das bombas de efluxo. A endocitose da nanopartícula com a lectina evita o seu efluxo pela P-glicoproteína. (Extraído de Bar-Zeev, 2017 (52))

Resumindo, as lectinas aumentam as interações com o muco gastrointestinal, o tempo de residência no lúmen gastrointestinal e aumentam também o seu transporte através da mucosa intestinal e absorção paracelular (14,19). Elas apresentam também uma resistência à degradação proteolítica (32).

4 Aplicações de nanopartículas conjugadas com lectinas

As lectinas apresentam um elevado potencial para uso em nanopartículas, visto que elas medeiam a mucoadesão, citoadesão e citoinvasão dos fármacos, melhorando a absorção e biodisponibilidade (14). Quando as lectinas se ligam à membrana epitelial, elas não agem meramente como bioadesivos, mas sim também como sinalizadores celulares que desencadeiam processos vesiculares de transporte por endocitose ou transcitose (19). **A afinidade da ligação** é dos critérios mais importantes quando se está a construir uma matriz de transporte e os ligandos das nanopartículas vão ter que competir nos receptores com todos os outros ligandos endógenos presentes *in vivo* (14). As lectinas têm especificidade moderada, mas é compensada com uma alta afinidade de ligação (19).

Por exemplo, a WGA (que tem especificidade para o ácido siálico e a *N*-acetilglucosamina) é uma das lectinas menos imunogénicas e com receptores glicosilados específicos no epitélio intestinal e alveolar. Isto potencializa o seu uso em formulações orais e aerossóis (32,51). O Transporte para os pulmões tem sido objeto de grande estudo por dirigir a ação farmacológica ao órgão alvo e fornecer uma grande superfície de baixa atividade metabólica para absorção sistémica (51).

Seguem-se agora alguns casos em que se tentou realizar o tratamento de uma patologia específica com nanopartículas que foram conjugadas a uma ou mais lectinas.

4.1 Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças contagiosas mais predominantes no mundo e a sua frequência tem estado a aumentar devido ao aumento do HIV/SIDA. Apesar de existir medicação de baixo custo e eficaz, a tuberculose possui cada vez mais estirpes resistentes (*multi drug resistant (MDR)* e *extensively drug resistant (XDR)*), o que tem evitado a total erradicação desta doença (53). Existem poucos antibióticos disponíveis para o tratamento e poucos estão na *pipeline* de lançamento nos próximos anos. A **isoniazida, etambutol, rifampicina e pirazinamida** são a primeira linha de tratamento na tuberculose. Possuem 90% de eficácia mas geralmente são administrados durante 2 meses usando uma combinação dos 4 fármacos, seguido de 4 meses de rifampicina e isoniazida uma a três vezes por dia. Os **efeitos secundários**, tratamento prolongado e falta de alívio dos sintomas fazem com que exista uma elevada falta de adesão à terapêutica (53). Os efeitos secundários devem-se à distribuição do fármaco ser uniforme no corpo todo, sendo que a maioria das moléculas não atingem o alvo terapêutico, ficando acumuladas no corpo e causando **efeitos adversos** (53). Alguns desses efeitos adversos são: Febre, erupções cutâneas, neuropatia periférica, náusea, vômito, hepatite, icterícia, hiperuricemia e reações de hipersensibilidade (53).

Sabe-se que o **trato respiratório** apresenta em toda a sua extensão uma grande quantidade de receptores de **lectinas**, descoberto primeiro por Abu-Dahab *et al.* (2001), quando associaram lipossomas funcionais a células alveolares primárias humanas e células A549 (derivadas de adenocarcinoma humano) (51). Com este conhecimento, Sharma *et al.* (2015), utilizaram **nanopartículas de PLG (PLG-NPs)** revestidas com **WGA** e encapsuladas com **isoniazida, rifampicina e pirazinamida (PLG-NP-WGA)**, no tratamento da tuberculose, via **oral** e sob forma de **aerossol**.

O objectivo destas duas formulações, foi o de tentar reduzir a frequência de dosagem da terapia clássica, que utiliza por via oral estes três fármacos **antituberculares em forma livre (ATLs)**, e de melhorar a adesão à terapêutica da tuberculose (45). A bioadesão das nanopartículas poliméricas às mucosas irá aumentar a absorção do fármaco encapsulado nos tecidos infectados, aumentar o seu índice terapêutico, reduzir a toxicidade e diminuir o tempo de tratamento (54). Ao

adicionar ligandos bioadesivos (WGA) à superfície das NPs, aumentamos as suas propriedades bioadesivas (54).

Os conjugados **PLG-NP-WGA** e os **ATLs** foram administrados em porquinhos da Índia, por via oral e sob forma de aerossol. Foram utilizadas as mesmas concentrações dos 3 fármacos antituberculares nas **NPs orais**, **NPs nebulizadas** e **ATLs: Isoniazida 10mg/kg + rifampicina 25mg/kg + pirazinamida 25mg/kg**. As **NPs nebulizadas** tinham entre 350 a 400 nm sendo que 88% estavam no intervalo capaz de atingir os pulmões. Posteriormente, foi feita a comparação farmacocinética das duas nanopartículas com a da administração dos fármacos livres.

Ao aproveitar as características citoadesivas do WGA (que tem como alvo a *N*-acetil-D-glucosamina e o ácido siálico), associadas às propriedades das nanopartículas, Sharma *et al.* conseguiram aumentar o intervalo de tempo disponível para absorção e aumentar o gradiente de concentração entre o lado luminal e seroso das membranas. No caso da nebulização, ocorre ligação do WGA ao epitélio alveolar.

Os resultados mostraram um aumento da **semivida sérica**, do C_{max} , um prolongamento do T_{max} e um aumento da **área sob a curva** (um indicador da biodisponibilidade), face à administração oral dos **3 ATLs**. Isto quer dizer, que as **NPs** permaneceram por mais tempo na circulação sistémica e foram necessárias menos administrações para obter o mesmo efeito que os **3 antituberculares livres**. Nos 15 dias após as administrações nos porquinhos da Índia, haviam mais fármacos nos tecidos do fígado, pulmões e baço utilizando as **NPs** do que os **3 ATLs**. Utilizando as **NPs**, houve uma grande redução na quantidade de administrações necessárias para o efeito terapêutico: apenas 3 doses de nanopartículas orais ou 5 doses de nebulizações a cada 15 dias (**3 ou 5 doses/15 dias**) correspondiam às mesmas doses diárias dos **ATLs** nesse mesmo período (**3doses/dia** para um total de **45 doses em 15 dias**), sem unidades de formação de colónias e sem hepatotoxicidade visível (32,54).

Esta abordagem terapêutica poderá reduzir a indução de resistências contra os antibióticos, a toxicidade da terapia e poderá ainda melhorar a qualidade de vida do doente por reduzir o número de administrações necessárias para o tratamento (32).

4.2 Cancro

A alteração da expressão de hidratos de carbono à superfície das células tumorais, também denominados de **TACAs** (*tumor-associated carbohydrate antigens*), é muito importante nos processos tumorais, incluindo na metástase (8). Os **TACAs** afetam as interações com as células normais e estão envolvidos em processos de sobrevivência das células tumorais, adesão ao endotélio e à matriz extracelular, vascularização e outros processos da metástase (4). Os receptores das células cancerígenas têm elevada eficiência de captação, pois para a sua sobrevivência necessitam de abrir mais o seu ambiente interno (17). Algumas lectinas da imunidade inata e adaptativa reconhecem os TACAs das células tumorais (4).

As lectinas apresentam também efeito anticancerinogénico. No entanto, elas são aplicadas maioritariamente à superfície das nanopartículas pela sua afinidade à célula-alvo (*direct lectin targeting*) (55). A tabela A6. resume algumas das aplicações de lectina e hidratos de carbono em nanopartículas que atingem tumores e células cancerígenas. Segue-se agora um exemplo na terapia da leucemia mieloide crónica.

4.2.1 Leucemia mieloide crónica

A leucemia mieloide crónica é uma doença que apresenta uma proliferação de células granulocíticas sem a perda da capacidade de diferenciação. É também caracterizada pela translocação Philadelphia, uma anormalidade específica no cromossoma 22 das células da leucemia mieloide. Devido à translocação entre o cromossoma 9 e 22, ocorre um gene de fusão p210^{Bcr-Abl}. A Bcr-Abl, que constitui uma tirosina quinase ativa "sempre ligada", promove fatores de crescimento independentes da proliferação celular ao ativar as vias PI3K/AKT, Stat 5, Ras/MEK/Erk e, ao regular positivamente as proteínas antiapoptóticas. Para mais, as células da leucemia mieloide são resistentes à indução da apoptose através de vários agentes como o **TNF α** e o **CD95/FasL** (56).

A quimioterapia é a principal estratégia para tratar a leucemia mieloide crónica porque ao contrário dos tumores sólidos, os tumores hematológicos malignos não podem ser tratados por remoção cirúrgica ou terapia de radiação. No entanto, o maior

obstáculo associado à quimioterapia é a resistência das células leucémicas aos vários agentes quimioterapêuticos. A maior parte dos fármacos antitumorais induzem apoptose ao iniciar a via intrínseca mitocondrial ou a via citocromo C/Apaf-1/caspase 9. A expressão de Bcr-Abl, a mutação do P53 e a deficiência do receptor Fas e da Apaf-1 bloqueiam as vias apoptóticas na leucemia mieloide crônica (56).

Uma possível solução, será a utilização de nanopartículas para a entrega do fármaco paclitaxel nas células leucémicas. O paclitaxel é um antitumoral potente que se liga às subunidades de tubulina nos microtúbulos, levando à interrupção da mitose e à apoptose (56).

Singh *et al.* (2011), propuseram uma formulação de nanopartículas magnéticas (MNPs) de Fe_3O_4 encapsuladas com paclitaxel e lectinas tipo C humanas (CLL-1) para o tratamento e diagnóstico da leucemia mieloide (56). As lectinas tipo C humanas (CLL-1) são as glicoproteínas expressas nas células mieloides derivadas do sangue periférico e medula óssea (57). As nanopartículas foram também revestidas com monoestearato de glicerol que permite a dispersão aquosa e a incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (56).

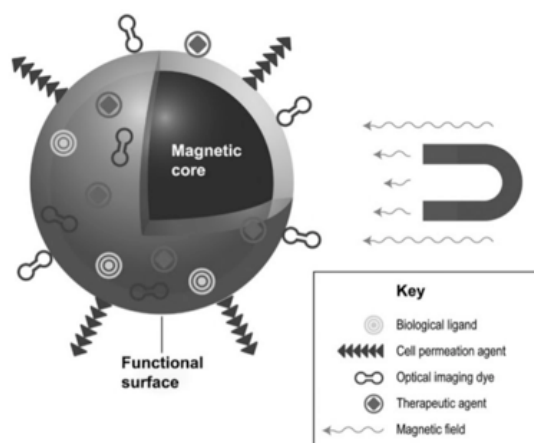


Figura 4.1 Esquema de uma nanopartícula magnética e as suas conjugações possíveis. São possíveis ligarem-se ligandos biológicos, agentes que permitem a permeação celular, agentes de contraste e agentes terapêuticos.
(Extraído de Grumezescu, 2017 (1))

Em todos os ensaios feitos por Singh *et al.* (2011), foram comparadas as atividades entre uma formulação de paclitaxel livre, paclitaxel dentro de MNPs (**pac-MNPs**) e paclitaxel dentro de MNPs conjugadas com lectinas (**pac-lec-MNPs**). A aplicação destas nanopartículas magnéticas foi testada em:

a) Imagem por ressonância magnética *in vitro*

As nanopartículas magnéticas possuem boas características para uso como contraste em imagem por ressonância magnética (IRM). De facto, Singh *et al.* (2011) viram uma redução no tempo de relaxamento T_2 da IRM utilizando sucessivos aumentos de concentração de pac-MNPs. O uso de pac-MNPs e lec-pac-MNPs como contraste em células K562 de leucemia mieloide revelou também uma redução no tempo de relaxamento T_2 . Esta descoberta sugere de facto que os pac-MNPs são bons candidatos para servirem de contraste de IRM (56).

b) Avaliação *in vitro* da absorção dos conjugados de nanopartículas em células K562 por citometria de fluxo

Utilizou-se a citometria de fluxo para analisar a absorção do paclitaxel livre, do **pac-MNPs** e **lec-pac-MNPs** em células K562 (Figura 4.2). Para isso, as três formulações foram conjugadas com o marcador 6-cumarina e incubadas com as células K562. A maior absorção foi obtida para a lec-6-cumarina-MNPs (Figura 4.2).

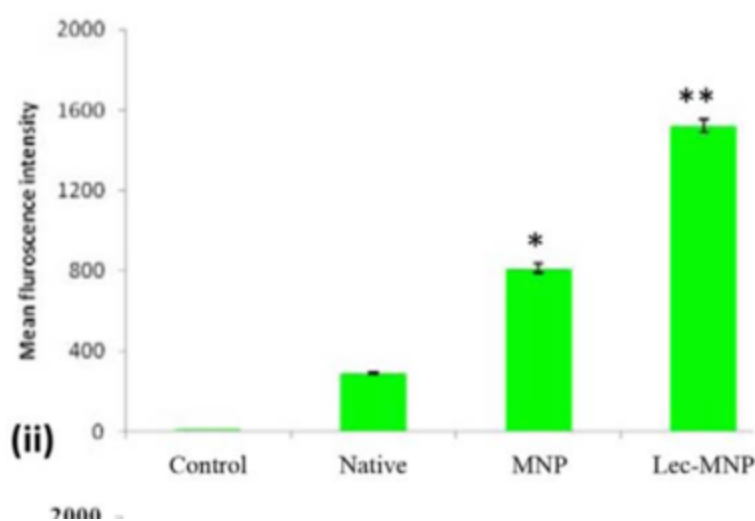


Figura 4.2 Intensidade de fluorescência média através de citometria de fluxo. Foram utilizados: um controlo de células incubadas com o meio sem 6-cumarina e nanopartículas (Control), células incubadas com 6-cumarina livre (Native), células incubadas com 6-cumarina-MNPs (MNPs) e células incubadas com Lec-6-cumarina-MNPs (Lec-MNP). (Extraído de Singh, 2011 (56))

Se a absorção das lec-MNPs é feita por endocitose, então por obrigação tem que ser afetada por mecanismos de antagonismo competitivo. Para comprovar que as lec-MNPs são endocitadas, numa segunda análise de citometria de fluxo

acrescentaram-se concentrações crescentes de lectina livre à lec-6-coumarina-MNPs. O resultado foi que ocorreu uma diminuição progressiva da lec-6-coumarina-MNP ligada, tendo ocorrido competição pela ligação às células K562.

c) Aplicações farmacocinéticas *in vivo*

Os estudos de farmacocinética *in vivo* tendo o rato como modelo animal foram realizados com paclitaxel livre, pac-MNPs e lec-pac-MNPs por injeção intravenosa. A maior concentração ocorre após 30 minutos (Figura 4.3).

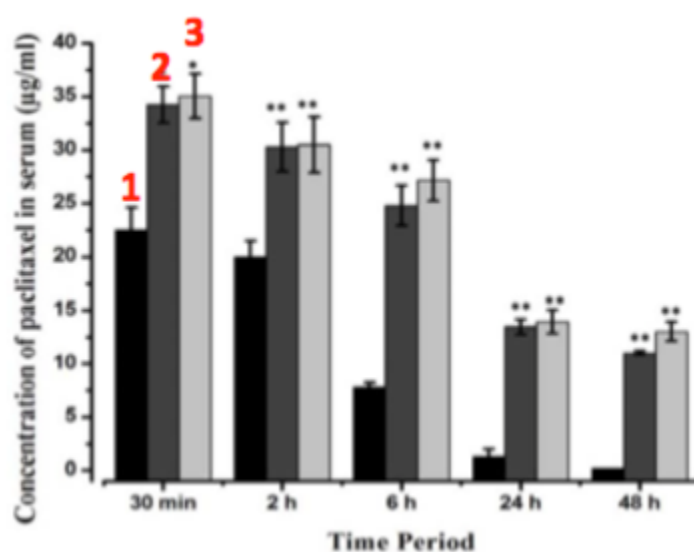


Figura 4.3 Avaliação da biodisponibilidade *in vivo* de: 1) paclitaxel livre 2) pac-MNPs 3) lec-pac-MNPs. Os ratos foram divididos em três grupos e foram-lhes administrados quantidades equivalentes das três formulações via intravenosa. (Extraído de Singh, 2011 (56))

Da análise da figura 4.3, **48 horas** após a injeção já não existem mais níveis de paclitaxel livre. No entanto, ainda há níveis de pac-MNPs e lec-pac-MNPs. O $T_{1/2}$ do paclitaxel livre foi de **5 horas** e os $T_{1/2}$ do pac-MNPs e lec-pac-MNPs foram de **15 horas**. O **C_{max}** (Concentração máxima) também foi maior no pac-MNP e lec-pac-MNP.

d) Citotoxicidade do conjugado lec-pac-MNP nas células K562

Os valores calculados de IC_{50} para a inibição do ciclo celular das células K562 (na tabela 4.1) demonstraram um valor antiproliferativo superior para os **lec-pac-**

MPNs. Após 48 horas, estes têm 67 vezes mais eficácia que o paclitaxel livre e 10 vezes mais eficácia que os pac-MPNs.

Tabela 4.1 Valores de IC₅₀ (Concentração inibitória média) para a inibição do ciclo celular das células K562. Os valores foram obtidos para a formulação de paclitaxel livre, pac-MNP, lec-pac-MNP. (Adaptado de Singh , 2011 (56))

Amostra	IC ₅₀ (ng/mL)
Paclitaxel livre	40.6 ±1.4
Pac-MNPs	6.3 ± 0.7
Lec-pac-MNPs	0.6 ± 0.02

O paclitaxel induz a paragem do ciclo celular em G₂-M nas células K562 sendo este efeito mais observado nas células tratadas com lec-pac-MNPs (70.6% das células vs. 40% com paclitaxel livre e 46% com pac-MNPs). As lec-pac-MNPs induziram apoptose em 40% das células após 24 horas de tratamento, valor este que aumentou para 51%, 48 horas após o tratamento. Os valores foram menores na pac-MNP (22% e 30%) e no paclitaxel livre (13% e 18%). O PCR (*Polymerase chain reaction*) em tempo real nas células K562 revelou que a lec-pac-MNP foi a que mais aumentou a expressão de **caspase 8, t-Bid , Bax, Caspase 3** e as que mais reduziram a **Bcr-Abl e Bcl-2**. A lec-pac-MNPs é portanto a melhor formulação para induzir apoptose das células K562.

e) Mecanismo de ação do paclitaxel

Os estudos de *immunoblotting* nas células K562 mostraram quais os mecanismos de apoptose causados pelas **lec-pac-MNPs** ao detectar a variação das concentrações de Fas L, Bid, t-Bid, Bax, Caspase 8, Caspase 9, Bcl-2, Bcr-Abl, Bad, p21, JNK e p38 MAPK. A leitura dos resultados obtidos sugerem que as lec-pac-

MNPs após entrarem nas células por endocitose exercem efeito apoptótico pela via extrínseca e intrínseca.

O **paclitaxel** causa apoptose **via intrínseca** por ativação de vias sinalizadoras de stress como o p38MAPK e JNK, que aumentam após o tratamento. A ativação do JNK pode causar instabilidade ao complexo Bcr-Abl e induzir os sinais proapoptóticos Bax e P21. Também foi detectada que a JNK originou uma redução no sinal antiapoptótico Bcl-2. Por esta *down-regulation* da Bcl-2, o aumento das proteínas proapoptóticas Bad e Bax levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e libertação de citocromo C, com consequente ativação da cascata de caspases.

A via **extrínseca** induz clivagem da caspase 8 através do TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*). O TRAIL está relacionado com a via mitocondrial através do Bid ou directamente à clivagem da caspase 8.

A caspase 9 da via intrínseca e a caspase 8 da via extrínseca dão origem à clivagem da caspase 3, levando à apoptose. De facto, houve aumento de caspase 3 clivada detectada no imunoblotting, o que significará que ocorreu apoptose.

Um esquema do mecanismo de ação do paclitaxel dentro da célula de leucemia mieloide apresenta-se nos anexos (Figura A5.).

4.3 *Diabetes mellitus*

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por um aumento da gluconeogénese, aumento da glicólise no fígado e hiperglicémia sistémica (50).

A doença está classificada em dois tipos:

- 1) A diabetes tipo 1 é dependente de insulina, devido à destruição das células β Langerhans do pâncreas, que secretam insulina (45).
- 2) A diabetes tipo 2 é caracterizada por resistência à insulina, por baixa capacidade de resposta das células à insulina, mas pode também haver deficiente secreção da hormona (50).

Hoje em dia, para a diabetes *mellitus* tipo 1, a injeção diária de insulina

continua a ser o tratamento mais utilizado no mundo, bem como o controle dos níveis de glicose no sangue, exercício físico e alterações na dieta (45).

Desde o desenvolvimento da insulina em 1921 que os investigadores tentam fazer uma formulação eficaz de insulina oral, até hoje sem sucesso. No entanto, em 2014, uma empresa recebeu pela primeira vez aprovação pela FDA para a fase III de ensaios clínicos (58). Uma via de administração não-parentérica iria minimizar os problemas que as injeções repetidas de insulina causam, a necessidade de esterilidade nas preparações e simplificar a técnica farmacêutica (50).

As injeções repetidas de insulina podem causar **lipoatrofia** e **hiperinsulinemia** periférica no tecido subcutâneo, o que pode levar a uma expressão exagerada de crescimento celular, divisão celular e outras respostas metabólicas (45,50).

Uma possível administração via oral apresentaria vantagens a nível de conforto físico e psicológico do doente. A adesão à terapêutica e a qualidade de vida também seriam extremamente melhoradas (50,58). No entanto, a via oral não é eficaz para a absorção de péptidos e proteínas, pois são digeridas pelo trato gastrointestinal em moléculas mais pequenas e fáceis de absorver (50). Para mais, a insulina é uma proteína hidrofílica com um elevado peso molecular (6000 Da), o que a faz difícil de encapsular em matrizes hidrofóbicas (43). A extensa degradação no trato gastrointestinal, baixa permeabilidade pelo epitélio intestinal e o efeito de primeira passagem no fígado fazem com que a insulina tenha uma biodisponibilidade oral de menos de 1% (45,50).

Zhang *et al.* (2005) avaliaram em ratos diabéticos, por via oral, o potencial de uma formulação de **lipossomas encapsulados com insulina e revestidos com lectinas**. Realizaram estudos de comparação entre três lectinas diferentes e observaram se alguma das lectinas iria aumentar a absorção oral do lipossoma com insulina. As lectinas utilizadas foram a WGA, a lectina do tomate (TL) e a aglutinina *Ulex europaeus* 1 (UEA-1) (41).

As biodisponibilidades relativas dos três lipossomas comparadas à injeção abdominal de insulina foram respectivamente 9.12%, 7.89% e 5.37%. A formulação com melhor biodisponibilidade e absorção foi portanto a que utilizou WGA. O efeito redutor de glicose nos lipossomas durou até 12 horas após administração oral. As

biodisponibilidades continuam a ser más face à injeção subcutânea, mas são melhores que pela administração oral do lipossoma sem o revestimento de lectinas. Apesar de tudo, é um grande passo à frente na tentativa de obter uma insulina oral viável. Os autores concluem que talvez ao acrescentarem inibidores enzimáticos e inibidores de proteases nos lipossomas se poderá aumentar a biodisponibilidade. Ficará esta ideia para uma possibilidade numa investigação futura (41).

Outra formulação de insulina oral foi realizada por Kim *et al.* (2005), utilizando micropartículas biodegradáveis de **alginate conjugadas com WGA**. O alginato é um polímero natural e biodegradável com boas propriedades de matriz para entrega de proteínas, fármacos e células. Testes *in vitro* com mucinas de porco mostraram três vezes mais interações com a formulação alginato-WGA do que com a formulação que só apresentava alginato (Figura 4.4) (59). As mucinas apresentam ácido siálico às suas superfícies que é específica para a WGA que está conjugada com as micropartículas (19).

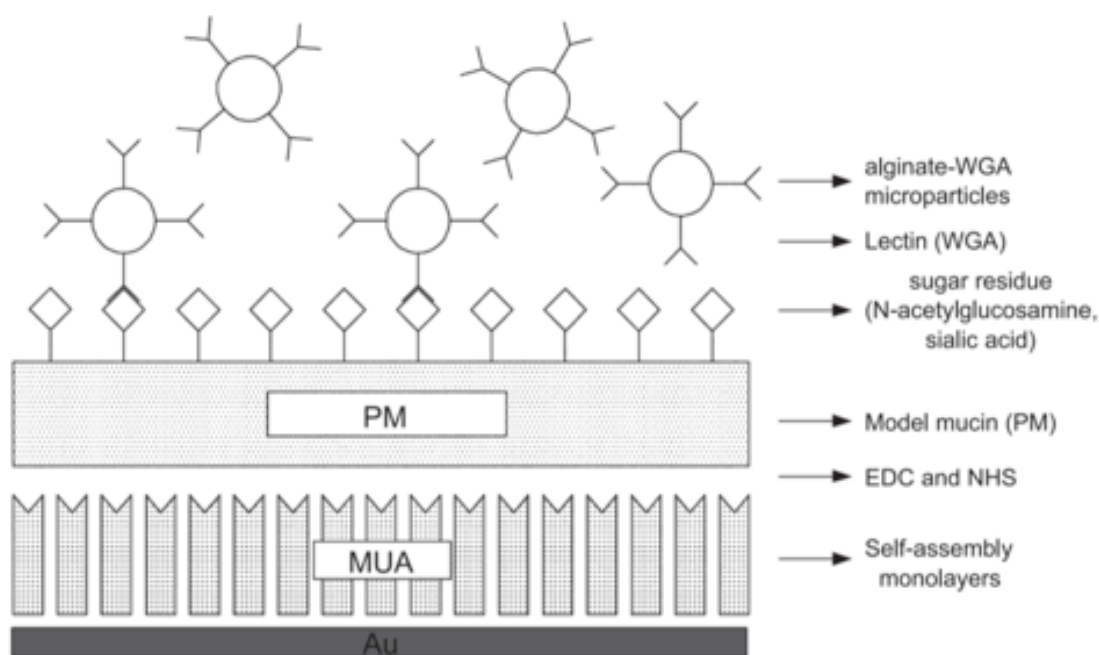


Figura 4.4 Esquema das interações entre as micropartículas alginato-WGA e a mucina de porco immobilizada num biosensor de *surface plasmon resonance*. Monocamadas de MUA foram depositadas na superfície de Au e reagidas com EDC e NHS para imobilizar a mucina de porco. Após a imobilização, foram medidas as interações entre as micropartículas de alginato e a mucina de porco. Legenda: alginate-WGA microparticles: Micropartículas de alginato conjugadas com lectina WGA, PM: Mucina de porco, EDC: *3-ethyl carbodiimide hydrochloride*, NHS: *N-hydroxysuccinimide*, MUA: *11-Mercaptoundecanoic acid*. (Extraído de Kim,2005 (59))

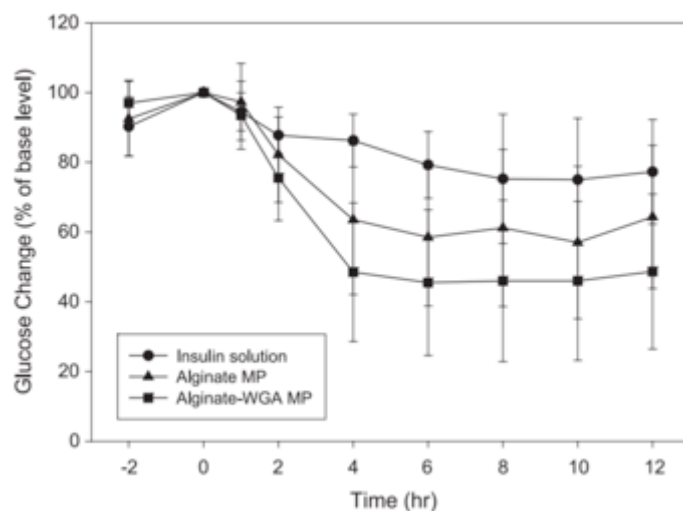


Figura 4.5 Efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos após administração oral de solução de insulina, micropartículas de alginato livres e micropartículas de alginato-WGA. (Extraído de Kim,2005 (59))

In vivo, em ratos diabéticos, a formulação alginato-WGA também mostrou maior redução na concentração de glucose: 4 horas após a administração houve uma redução dos níveis plasmáticos de glucose, que duraram 8 horas (Figura 4.5).

Já foram feitas outras tentativas para tentar produzir uma formulação de insulina oral, mas outro obstáculo parece ser a produção em grande escala. Passar de uma produção laboratorial a uma produção industrial depende de vários fatores como a técnica laboratorial, temperatura, biocompatibilidade dos excipientes e solventes orgânicos (58). As nanopartículas apresentam uma reprodutibilidade difícil, o que dificulta o seu potencial uso clínico e comercial, sendo que por enquanto ainda não são consideradas a melhor solução para uma formulação de insulina oral comercializável (58). Outros problemas associados a várias nanopartículas de insulina testadas foram a má biodisponibilidade, elevada toxicidade e diferenças elevadas de absorção intraindividuais. A alteração de características das nanopartículas como o tamanho, estabilidade nos fluidos biológicos após administração *in vivo*, composição química superficial e interna são alguns dos parâmetros que no futuro poderão permitir a concretização de uma nanoformulação de insulina eficaz (45).

4.4 Doença de Alzheimer

O bFGF (*basic fibroblast growth factor*) é um polipéptido que promove a sobrevivência e crescimento neuronal, *in vitro* e *in vivo*. Ele modula a transmissão sináptica no hipocampo e **interrompe** a cascada neurotóxica induzida pela beta amiloide (A β), o que resulta na inibição da formação das placas de amiloide envolvidas na doença de Alzheimer. Infelizmente, a absorção do bFGF através da barreira hematoencefálica é muito reduzida (menos de 1%) e a sua acumulação nos tecidos periféricos resulta em elevados efeitos secundários. Por isso, ele é normalmente administrado por **injeção intracerebroventricular** (60).

A barreira hematoencefálica continua a ser o maior obstáculo para o tratamento de doenças cerebrais porque impede as moléculas grandes como os péptidos e as proteínas de entrarem no sistema nervoso central. É composta por células endoteliais estreitamente unidas e que têm pouco espaço entre si para a passagem de substâncias. A passagem através da barreira hematoencefálica depende bastante das propriedades da molécula e não só do tamanho. Apenas as moléculas de baixo peso molecular e moléculas lipofílicas conseguem passar, sendo que outras moléculas importantes como a glicose são transportadas por proteínas específicas (60). As células endoteliais cerebrais têm uma atividade pinocítica baixa e elevadas concentrações de P-glicoproteína, responsável pelo efluxo dos fármacos (61).

A **administração intranasal** é uma boa alternativa não-invasiva que tem possibilidades de transportar fármacos **diretamente ao SNC** sem passar pela barreira hematoencefálica. O fármaco deposita-se na mucosa nasal e migra através dos nervos olfatório e trigêmeo até ao SNC (18).

Para o tratamento da doença de Alzheimer em ratos, Zhang *et al.* (2014) construíram **nanopartículas PEG-PLGA contendo bFGF e conjugadas com lectinas *Solanum tuberosum* (STL)** para administração via intranasal (60). A STL foi utilizada porque tem boa tolerância ao calor e ao ambiente ácido-base, e possui ainda uma baixa imunogenicidade, o que a torna boa para aplicações farmacêuticas. Ela liga-se seletivamente à ***N*-acetilglucosamina**, que é muito abundante na **membrana epitelial nasal**. Com a STL irá ocorrer mucoadesão e citoadesão, seguindo-se endocitose e transporte através do epitélio nasal até ao SNC. O PEG à volta das

nanopartículas previne a agregação quando entram em contacto com a mucosa nasal. (60).

Várias formulações diferentes e com diferentes concentrações foram testadas: bFGF livre via intravenosa, bFGF livre via intranasal (i.n), bFGF em nanopartículas simples via intranasal e bFGF em nanopartículas contendo STLs via intranasal. A tabela 4.2 resume todos os grupos de ratos presentes nos ensaios *in vivo*.

Tabela 4.2 Grupos de ratos e tratamentos recebidos.

(Adaptado de Zhang, 2014 (60))

Grupo	Tratamento (durante 17 dias)
Sham (Ratos saudáveis)	Solução i.n salina, 20µL/dia
AD controlo (Ratos com Alzheimer)	Solução i.n salina, 20µL/dia
IN-bFGF (20)	Solução i.n bFGF, 20µg/kg/dia
IN-bFGF (40)	Solução i.n bFGF, 40µg/kg/dia
IN-bFGF-NP (20)	bFGF-NP i.n, 20µg/kg/dia
IN-bFGF-NP (40)	bFGF-NP i.n, 40µg/kg/dia
IN-STL-bFGF-NP (20)	STL-bFGF-NP i.n, 20µg/kg/dia
IV-bFGF (40)	Solução intravenosa bFGF, 40µg/kg/dia

Após administração nos grupos, o pico de concentração máxima no bulbo olfatório foi aos 30 minutos. Nos outros tecidos cerebrais foi entre 2-4 horas. A atividade de Colina acetiltransferase (AChT), uma enzima cuja atividade reduzida é associada à disfunção cognitiva, foi medida em todas as formulações experimentadas, apresentando-se na figura 4.6.

A maior atividade de AChT foi observada nas nanopartículas de bFGF que contêm lectinas (IN-STL-bFGF-NPs), mesmo quando foi duplicada a concentração de bFGF de 20 µm/mL para 40 µm/mL na formulação sem STLs (IN-bFGF-NP (40)). As IN-STL-bFGF-NPs obtiveram também a melhor biodisponibilidade entre todas as formulações testadas, incluindo a intravenosa (60).

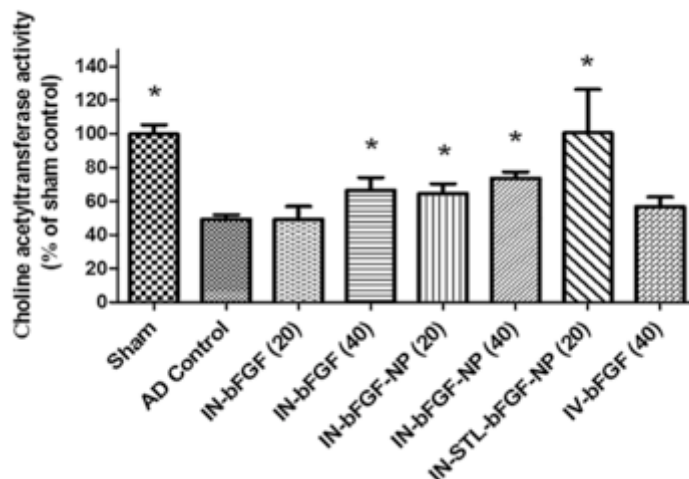


Figura 4.6 Níveis de atividade de AchT no hipocampo de ratos com Alzheimer tratados com várias preparações contendo bFGF. Dois grupos controle estão presentes, um com ratos saudáveis (Sham) e outro com ratos com Alzheimer sem tratamento (AD Control). (Extraído de Zhang, 2014 (60))

Os ratos com Alzheimer do grupo que foi tratado com IN-STL-bFGF-NP demonstraram melhores capacidades de aprendizagem e memória que os grupos tratados com as outras formulações e que o grupo de controle que tinha ratos com Alzheimer e sem tratamento (60).

Nos cortes histológicos realizados (Figura 4.7), observaram-se poucas diferenças entre as células dos ratos saudáveis e a dos ratos doentes tratados com as nanopartículas de bFGF com lectinas. Não houve formação de placas A β e as células mostraram elevada coloração histoquímica nos nervos colinérgicos. Ocorreu, portanto, efeito neuroprotector das células nervosas utilizando as IN-STL-bFGF-NPs (60).

Uma formulação utilizando PEG-PLGA e STLs para administração intranasal foi também utilizada no tratamento da esquizofrenia. Neste caso, Piazza *et al.* encapsularam as nanopartículas com Haloperidol, um antipsicótico. Dado aos bons resultados obtidos até agora, preve-se que a via intranasal será mais explorada no futuro como via de administração para evitar a barreira hematoencefálica (62).

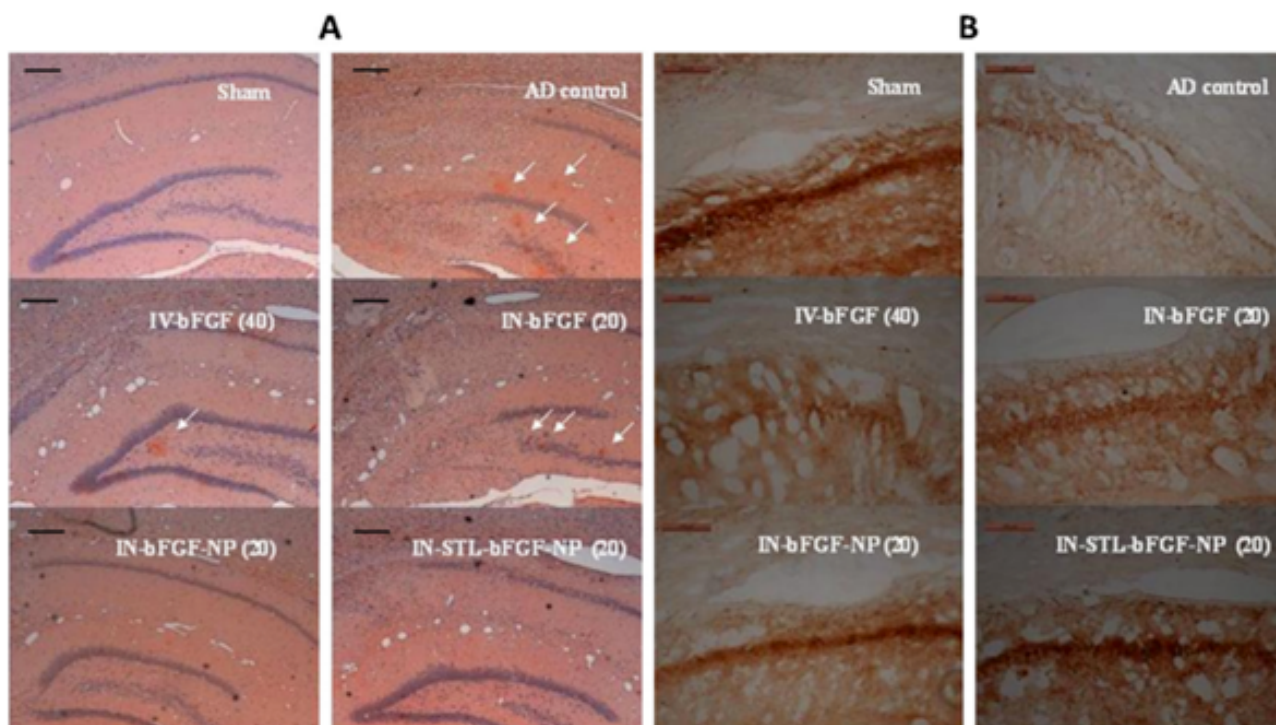


Figura 4.7 Cortes histológicas de ratos saudáveis e de ratos com Alzheimer tratados com preparações bFGF. Em A) foi feita a observação de placas A β e em B) a observação de nervos colinérgicos. (Extraído de Zhang, 2014 (60))

4.5 Colite Ulcerosa

A terapia normal da colite ulcerosa consiste em utilizar fármacos anti-inflamatórios para evitar ataques agudos e induzir remissão da inflamação. O problema surge pelos elevados efeitos secundários, pouca especificidade e disponibilidade no sítio da inflamação. Isto ocorre porque os mecanismos de libertação estão relacionados com parâmetros fisiológicos que não estão relacionados nem com a inflamação nem com a sua localização (7). A colite ulcerativa resulta na alteração da síntese e secreção de mucinas. Melo-Júnior *et al.* já tinham utilizado a **WGA** e **LTA**, que se ligam à **N-acetil-glucosamina** e à **L-fucose**, como marcadores das células inflamatórias da colite ulcerosa (7). O **WGA** e **LTA** foram capazes de se ligar às células inflamadas mas não às células saudáveis da mucosa intestinal (7).

A falta de seletividade destes fármacos para com o local de atuação levaram Moulari *et al.* (2014) a usar **betametasona encapsulada em NPs revestidas com**

WGA e com PNA (Peanut agglutinin) no tratamento da colite ulcerosa (63). A inflamação da mucosa gástrica está associada à perda da integridade da barreira epitelial. Isto vai permitir que as nanopartículas se acumulem junto dos macrófagos e enterócitos, aumentando a sua exposição junto dos receptores da inflamação (48).

O objectivo da formulação foi portanto o de atingir as células do sistema imunitário que desencadeiam os mecanismos da inflamação e exercer aí o seu efeito terapêutico. Pensa-se que numa terapia anti-inflamatória também se poderá usufruir do efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) das nanopartículas, como existe na terapia do cancro. O uso das lectinas face a anticorpos é mais favorável pois os anticorpos são instáveis no fluido intestinal e sofrem desnaturação proteolítica ou dependente de pH no trato GI (63).

Moulari *et al.* (2014) fizeram estudos *in vitro* utilizando células Caco-2 e RAW 264.7 que demonstraram que há elevada afinidade das lectinas às células, sendo maior nas células imunes ativadas que as não ativadas.

Nos estudos *in vivo*, viram que o revestimento com as lectinas aumentou a ligação das NPs ao tecido inflamado e apresentava elevada estabilidade no corpo. As nanopartículas com PNA obtiveram uma adesão maior ao tecido inflamado face às que possuíam WGA. Não é de surpreender: Sabe-se que a WGA tem uma adesão melhor ao tecido intestinal saudável e que o PNA tem uma adesão superior ao tecido inflamado, pois o seu sítio de ligação é sobre-expresso no estado inflamado das células (63).

4.6 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral, também conhecida pelo seu nome indiano *kala-azar*, é uma doença sistémica que é letal se não for tratada. É causada por protozoários do género *Leishmania*, nomeadamente *L.donovani*, *L.chagasi* e *L.infantum*. A sua transmissão é feita por zoonose, antroponose ou antropozoonose (de humano para vector e de volta a humano). O parasita infiltra-se dentro dos **macrófagos saudáveis** e deposita-se no **baço** e no **fígado**. Os sintomas da doença incluem febre, edema do fígado e baço, perda de peso, fadiga e anemia (64,65).

A maior parte dos fármacos usados para tratar a leishmaniose não penetram nos macrófagos infectados, havendo uma necessidade de desenvolver novos sistemas inovadores para atingirem as células parasitadas. Ademais, a terapia convencional da leishmaniose tem elevada toxicidade e começa a mostrar sinais de resistência por parte de algumas das estirpes parasitárias. A **anfotericina B** é um antifúngico que possui boa atividade contra a doença, o que leva a menores falhas e recaídas no tratamento. No entanto, possui elevada nefrotoxicidade. A **doxorrubicina** é outro fármaco que tem atividade anti-leishmaniose visceral, mas possui no entanto uma alta toxicidade renal e cardíaca (64,65).

Em ensaios *in vitro*, Gupta *et al.* (2017) encapsularam simultaneamente **Amfotericina B e Doxorrubicina em nanopartículas de PLGA revestidas com lectinas**, para obterem maior afinidade para os macrófagos e para o sistema reticuloendotelial. O tamanho reduzido das nanopartículas leva à sua acumulação nos órgãos ricos em macrófagos como o baço e o fígado, aumentando assim o número de interações entre as nanopartículas e o parasita (*Enhanced Permeability and Retention*). Ao ligarem-se aos receptores de manose dos macrófagos, as lectinas aumentam o *uptake* e endocitose para dentro das células, tornando o efeito das nanopartículas ainda mais potente. A vantagem desta abordagem será uma terapia muito mais dirigida, com maior tempo de atuação, com menor dose, e, como resultado, menor toxicidade (65).

4.7 Resposta autoimune

4.7.1 Conjugados de TP5 em nanopartículas de PLGA com WGA

A **Timopentina** (TP5) é um pentapéptido sintético (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) que constitui o segmento 32-36 da timopoiatina, uma hormona do timo que contém 49 aminoácidos. É um imunomodulador usado no tratamento de doenças autoimunes como a dermatite atópica, artrite reumatoide, leucemia linfocítica crônica, entre outras. Tem uma baixa permeabilidade de membrana e um metabolismo elevado no trato gastrointestinal. A sua semivida é de apenas 30 segundos, sendo necessário

durante o tratamento injeções ou infusões repetidas de TP5, o que minimiza a sua aplicação e potencial clínico (19).

Yin *et al.* (2006) incorporaram TP5 em nanopartículas de PLGA conjugadas com WGA de *Triticum vulgare* (TP5-PLGA-WGA), no âmbito de melhorar a absorção e biodisponibilidade da TP5. O WGA liga-se especificamente à *N*-acetilglucosamina e ácido siálico presentes nas **células M** e nas células normais intestinais (Figura 3.3). Utilizou-se a WGA por ter a maior afinidade para as células intestinais humanas, colonócitos humanos e células do cancro da próstata, bem como resistência ao pH ácido e degradação enzimática (19). Os testes *in vitro* com mucinas do porco (PM) demonstraram que a conjugação das NPs com WGA aumentou as interações entre 1.8 a 4.2 vezes mais comparado com as nanopartículas não conjugadas (19).

Em um outro estudo, Yin *et al.* (2017) testaram a eficácia da mesma formulação de TP5-PLGA-WGA *in vivo* e *ex vivo*, em ratos (por administração oral) e em segmentos de intestino de rato.

Nos estudos *ex vivo*, Yin *et al.* (2017) utilizaram mucosa intestinal de rato com e sem placas de Peyer para avaliar a bioadesão da formulação. Os resultados obtidos foram semelhantes nos dois tipos celulares (Figura 4.8). Isto parece indicar que devido à baixa presença das células de Peyer (1% das células totais da mucosa intestinal) comparativamente aos enterócitos, estas não vão ter grande importâncias na bioadesão e na absorção das nanopartículas (66).

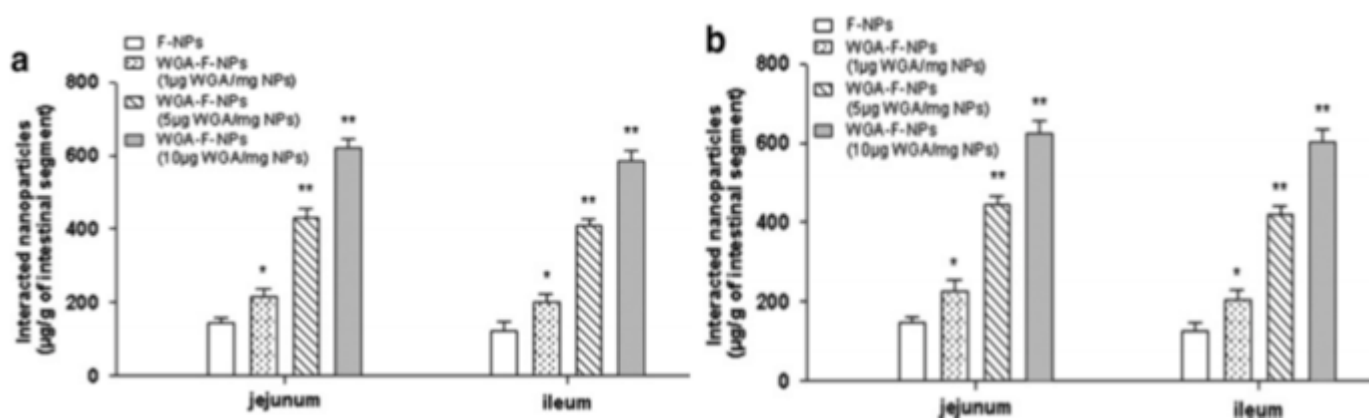


Figura 4.8 Interação de TP5-PLGA e TP5-PLGA-WGA com o jejuno e ileón. Em a) Células sem placas Peyer e b) Células com placas de Peyer. Foram utilizadas NPs ligadas a TP5 (F-NPs) e NPs conjugadas a lectinas WGA e ligadas a TP5 com 3 concentrações de WGA: 1µg WGA/mg NPs, 5µg WGA/mg NPs e 10µg WGA/mg NPs. (Extraído de Yin,2007 (34))

Conforme a figura 4.8, foi observada uma interação ligeiramente menor no íleon que no jejuno. Isto poderá ser devido a uma diminuição **progressiva da concentração de mucina** ao longo do trato intestinal, levando a menor mucoadesão (66).

Os estudos de farmacodinâmica *in vivo* mostraram que a distribuição da TP5-PLGA-WGA foi maioritariamente nos **intestinos delgados**. A TP5-PLGA-WGA obteve também uma bioadesão intestinal aumentada, níveis circulatórios sanguíneos elevados e atividade anti-fagocitária (**Fig A4.**) (66).

Existe uma correlação entre a quantidade de WGA presente nas nanopartículas e a absorção intestinal: o aumento em 10 vezes da concentração de WGA (de 1µg WGA/g NPs para 10µg WGA/g NPs) nas nanopartículas aumentou a absorção ocorrida em 2.9 vezes (Figura 4.8). Isto diz-nos que, apesar de ser necessária uma concentração mínima de WGA para acontecer absorção intestinal, uma densidade de WGA muito alta não resulta necessariamente em uma grande variação de absorção (66).

A conjugação de WGA nas partículas de PLGA foi assim provada ter melhorado a absorção oral da timopentina, sendo uma prospectiva futura para melhorar a terapêutica imunossupressora (66).

4.8 Infecções bacterianas

O desenvolvimento de resistências microbianas a fármacos é um dos maiores problemas de saúde pública no século XXI. Para além dos antibióticos clássicos, já têm sido desenvolvidas novas estratégias no sentido de combater a diminuição de eficácia desses fármacos (67).

Jayanthi *et al.* (2017) avaliaram a capacidade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata revestidas com lectinas purificadas de caranguejos *Portunus pelagicus*, tendo sido obtidos bons resultados (67).

As lectinas presentes nos crustáceos têm sido apontadas em estudos como tendo diversos papéis na sua imunidade inata e reconhecimento de patógenos. As nanopartículas de prata apresentam atividade antifúngica e potenciam a atividade

antibacteriana de outras moléculas (67).

Foram realizados ensaios *in vitro* em bactérias gram-positivas (*P.vulgaris* e *P.aeruginosa*) e gram-negativas (*E.faecalis* e *B.pumilus*). As atividades inibitórias foram comparadas entre as AgNPs (nanopartículas de prata) conjugadas com lectinas, um controlo, a lectina isolada e o nitrato de prata (Figura 4.9) (67).

Bacteria	Accession number	Zone of inhibition			
		Control	Lectin (100 µl)	AgNO ₃ (100 µl)	Lectin-coated Ag nanoparticles (100 µl)
<i>Proteus vulgaris</i>	HQ116441	-	++	+	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HQ693274	-	+	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	HQ693279	-	++	+	+++
<i>Bacillus pumilus</i>	HQ693273	-	+	+	++

Figura 4.9 Atividade antibacteriana da lectina, nitrato de prata e nanopartículas de Ag revestidas por lectinas em várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Extraído de Jayanthi, 2017 (67))

As AgNPs revestidas com lectinas demonstraram efeitos inibitórios superiores ao nitrato de prata e à lectina isolada. Jayanthi *et al.* também constataram uma redução na produção de biofilme, usando as nanopartículas com lectina. De facto, a produção de biofilme é ajudada pelo glicocálice das bactérias. A Figura 4.10 mostra o mecanismo de acção: A formulação penetra dentro do biofilme, exercendo dispersão e libertação da bactéria, que depois está livre para se ligar à lectina (67).

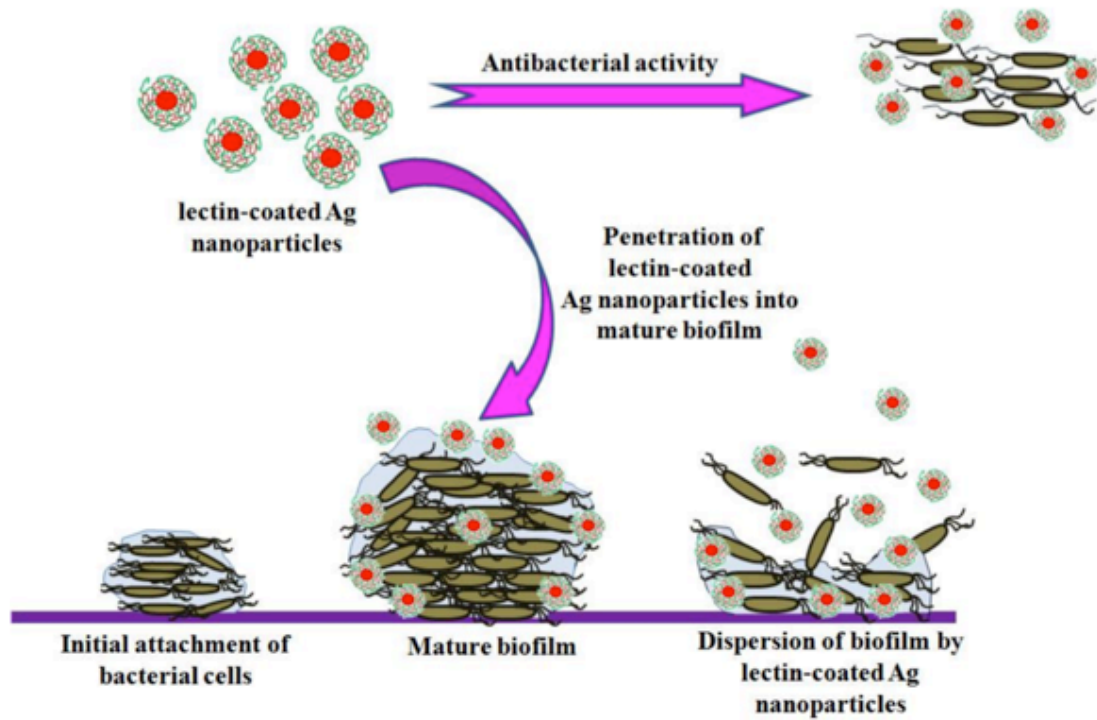


Figura 4.10 Mecanismo de ação das nanopartículas de Ag revestidas com lectinas.
(Extraído de Jayanthi, 2017(67))

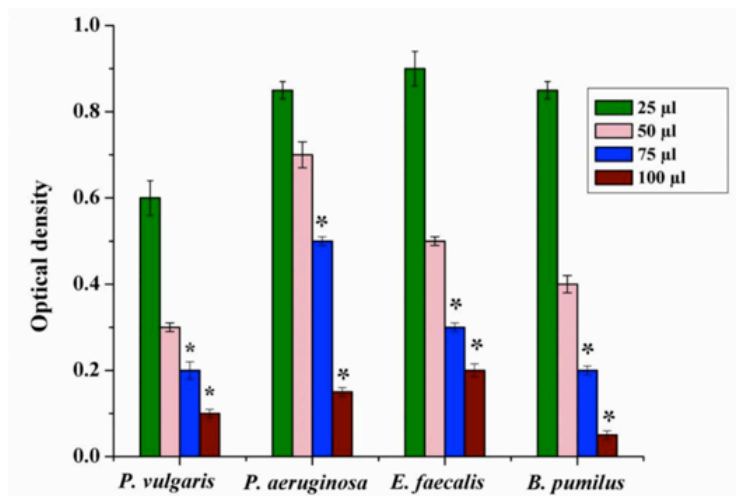


Figura 4.11 Inibição de crescimento bacteriano induzido pelas AgNPs revestidas com lectinas em várias bactérias.

(Extraído de Jayanthi, 2017(67))

A concentração mínima inibitória das AgNPs revestidas com lectinas foi de 100 µg/ml (Figura 4.11). A atividade redutora de biofilme foi observada a partir de 50 µg/ml (67).

5 Aplicações de nanopartículas conjugadas com hidratos de carbono

Os hidratos de carbono têm ganho atenção como ligandos devido ao seu peso molecular pequeno, alta biodisponibilidade, biocompatibilidade e facilidade de produção. Os seus alvos geralmente são as lectinas que estão expressas de maneira diferente ou em excesso na membrana celular e intracelular. Muitos hidratos de carbono como a manose, glucose, galactose e seus derivados já estão a ser considerados como potenciais ligandos em matrizes de nanopartículas dirigidas (40).

Apresentam-se agora alguns casos em que se utilizaram hidratos de carbono como ligandos das nanopartículas.

5.1 Resposta imune descontrolada

As respostas imunitárias indesejadas podem ocorrer em várias situações como no caso da doença autoimune, na rejeição de transplantes de órgãos, nas alergias e após administração de antígenos terapêuticos como por exemplo proteínas recombinantes ou anticorpos monoclonais. Os imunossupressores têm uma atuação muito generalizada que pode comprometer a imunidade geral do organismo. Para além disso, têm de ser aplicados em regimes de administração crónica (68).

Uma alternativa desejável, mais eficaz e segura, é induzir uma **tolerância imunitária** que seja específica a um antígeno. Nas abordagens praticadas até agora, essa indução é geralmente feita pela inibição dos linfócitos T específicos ao antígeno. A inibição é feita ou por anergia dos linfócitos T ou por indução dos linfócitos T

reguladores (uma subpopulação de células T que mantêm a tolerância a antígenos "self") (68).

Pang *et al.* (2017) apresentaram uma estratégia diferente envolvendo os linfócitos B. Os linfócitos B são os precursores das células B plasmáticas que são secretoras de anticorpos. Ao serem os linfócitos B os alvos terapêuticos, teremos uma maneira mais direta de induzir tolerância humoral aos antígenos desejados (68).

As células B expressam dois co-receptores inibitórios da família das **Siglecs**: o CD22 e o Siglec-G (Siglec-10 nos humanos). Ao apresentar às células B um antígeno (que se queira induzir tolerância) associado a ligandos do CD22 ou Siglec-G irá ocorrer:

- 1) inibição da ativação dos linfócitos B.
- 2) apoptose das células B reativas ao antígeno escolhido.
- 3) Diminuição das células B memória reativas a esse antígeno no organismo (68).

Foram então sugeridos por Pang *et al.* (2017) os "*Siglec-engaging tolerance-inducing antigenic liposomes*" (**STALs**), ou seja, lipossomas que se ligam a Siglecs e que induzem tolerância imunológica a um antígeno presente no lipossoma. O ligando utilizado foi o *α 2-6-linked sialic acid*. Ao injetarem os ratos com STALs, ocorre a prevenção de uma subsequente reação imunológica pelos linfócitos B (68).

Por exemplo, os STALs formulados com **Ara h 2**, o maior alérgeno proveniente do amendoim, já tinham sido demonstrados proteger em ratos a sensibilização e desenvolvimento de respostas alérgicas a amendoins. Isto porque as STALs têm a capacidade de prevenir respostas por parte de anticorpos mediados por células B em ratos *naïve* (68).

No entanto, em humanos a resposta imunitária é dada não só por linfócitos B mas também pela mediação B e T. Isto levará as STALs a causarem uma expressão excessiva de linfócitos T_h. Para ajudar nesse aspecto, foi acrescentado nas STALs rapamicina, um fármaco imunomodulador que inibe o mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e induz a paragem do ciclo celular em células T e B (68).

Foi testada por Pang *et al.* (2017) a capacidade dos STALs com rapamicina induzirem a tolerância a ratos previamente sensibilizados com um antígeno (Figura 5.1). Apesar de não ter sido conseguido prevenir completamente uma resposta pelas

células memória, houve uma redução visível da resposta imunitária descontrolada face aos ratos não tratados (68).

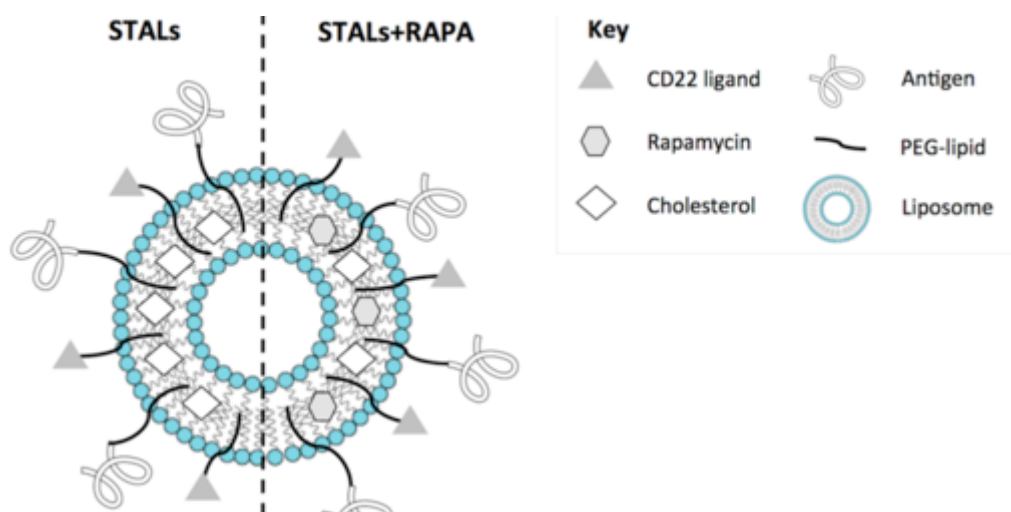


Figura 5.1 Esquema das nanopartículas de STAL e STAL+Rapamicina. (Extraído de Pang, 2017(68))

5.2 Cancro

Os tratamentos atuais para o cancro são muito invasivos ou intrusivos, através de cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Apesar destes tratamentos terem capacidade de atingir e matar células cancerígenas, atingem também as células normais, causando efeitos secundários. Os efeitos secundários são muito negativos para os doentes e pioram bastante a sua qualidade de vida (33).

As células neoplásicas expressam um elevado número de receptores na sua superfície, incluindo lectinas, que têm afinidade para hidratos de carbono. Estas lectinas de membrana são um possível "alvo" por parte de novas fórmulas farmacêuticas, visto que o padrão de glicosilação das células malignas é diferente das células normais (69).

Por exemplo, Jain *et al.* (2015) utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas ancoradas com galactose para aumentar a doxorubicina nas células alvo tumorais. A doxorubicina tem efeito antitumoral intercalando-se com DNA ou DNA topoisomerase II, levando à interrupção do ciclo celular. Mas, possui também elevada cardiotoxicidade. Ao colocar a doxorubicina dentro de uma nanoformulação, os efeitos adversos são atenuados por haver entrega seletiva às células cancerígenas (69).

Seguem-se agora algumas aplicações específicas em vários tipos de cancros.

5.2.1 Cancro da próstata

O método de detecção standard para o cancro da próstata é o PSA (*Prostate specific antigen*). No entanto, este apresenta uma baixa especificidade, pois também está presente em níveis altos em doentes com hiperplasia benigna da próstata. Isto poderá levar ao tratamento de doentes que não apresentam cancros malignos ou que estejam em fase muito cedo da doença (70).

Vaillant *et al.* (2015) aproveitaram a sobre-expressão de uma **lectina** de membrana presente em células do cancro da próstata, a **M6PR** (*mannose 6-phosphate receptor*), para fins de diagnóstico e tratamento através de terapia fotodinâmica (70).

A terapia fotodinâmica é um tipo de tratamento que utiliza um agente foto-sensibilizador que quando exposto a uma frequência de luz particular, produz oxigénio que destrói as células. Este agente é absorvido por todas as células do corpo mas tem maior afinidade pelas células cancerígenas. Entre 24 a 72 horas após a injeção do agente foto-sensibilizador, o tumor é exposto à frequência de luz, causando a libertação de oxigénio molecular e consequente morte celular. A terapia fotodinâmica tem a capacidade de destruir ou reduzir o tamanho dos tumores e de danificar os seus vasos sanguíneos, dificultando a absorção de nutrientes necessários ao crescimento e metástase (71–73).

O M6PR é por vezes descrito como sendo um supressor antitumoral, por apresentar níveis reduzidos nos ovários, fígado e pulmões. Mas, recentemente, anticorpos anti-M6PR foram identificados no soro de 30% dos doentes que têm cancro da próstata (70).

Para descobrirem se podem usar o M6PR como alvo terapêutico, Vaillant *et al.* (2015) realizaram primeiro uma análise do nível de expressão de M6PR (com recurso a anticorpos anti-M6PR) em tecidos de 126 doentes com cancro prostático. Estes valores foram depois comparados com os dos tecidos de 39 próstatas saudáveis (Figura 5.2) (70).

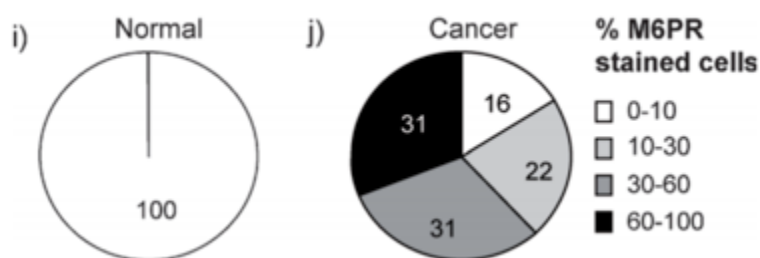


Figura 5.2 Expressão de M6PR em células normais e cancerígenas da próstata. (Extraído de Vaillant, 2015 (70))

A sobre-expressão de M6PR está presente em 84% dos 126 tecidos cancerígenos, e não há expressão em tecidos normais ou de hiperplasia benigna da próstata. Ocorreu também sobre-expressão em tecidos cujo cancro ainda estava fase inicial. Os resultados obtidos são muito positivos para empregar o M6PR como alvo terapêutico (70).

Vaillant *et al.* (2015) sintetizaram **um hidrato de carbono complementar para o receptor M6PR (M6C)** e colocaram-no à superfície de nanopartículas de sílica mesoporosas (MSNs) encapsuladas com dois foto-sensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica (MSN-NH₂-1PS e MSN-NH₂-2PS) (70). O M6C ao ter uma afinidade muito elevada para o M6PR, vai permitir que as nanopartículas sejam endocitadas **apenas** pelas células cancerígenas (70). Os ensaios *in vitro* foram depois realizados nas linhas celulares de cancro prostático LNCaP.

Os MSN-NH₂-1PS e MSN-NH₂-2PS causaram 96% e 55% de morte celular, respectivamente, nas linhas celulares LNCaP. A MSN-NH₂-1PS mostrou 75% de morte celular em culturas de células primárias isoladas de doentes, mostrando uma excelente eficácia (70).

5.2.2 Carcinoma hepatocelular

A **lectina hepática asialoglicoproteína receptora (ASGPR)** é sobre-expressa no carcinoma hepatocelular, existindo cerca de meio milhão de ASGPRs por cada hepatócito. Em outras zonas do corpo não existe muita expressão de ASGPR (74).

Muhammad *et al.* (2016) desenvolveram **nanopartículas PLGA revestidas de galactosamina e encapsuladas com Pt^{IV} e α -TOS** para atingir a sobre-expressão de receptores ASGPRs no cancro do fígado, dando origem a uma respostas mais específica e menos tóxica que utilizando terapia à base de platina isolada (75).

Pensa-se que o efeito antitumoral da α -TOS vem da inibição das proteínas antiapoptóticas **Bcl-xL/Bcl-2** ou na geração de espécies reativas de oxigénio (ROS). No entanto, a α -TOS é susceptível a esterases, tendo uma baixa estabilidade e retenção no corpo. A sua aplicação em nanoformulações irá reduzir o seu contacto com as esterases, aumentar a biodisponibilidade e dar um efeito sinérgico à Pt^{IV} (75). A galactosilação do PLGA permite aumentar o *uptake* por parte das células cancerígenas, visto que são as que expressam em maior número o ASGPR (75).

Pranatharthiharan *et al.* (2017) realizaram outra nanoformulação que tem como alvo os receptores ASGPRs no carcinoma hepatocelular. Utilizaram nanopartículas ***Polyethersulfone (PES)* encapsuladas com doxorubicina e revestidas com pullulan**. O pullulano é um polissacárido que não é tóxico, imunogénico, mutagénico, cancerígeno e que tem afinidade para as ASGPRs. É uma hipótese futura em novas nanopartículas que tenham como alvo os ASGPRs (74).

5.2.3 Evasão do sistema mononuclear fagocitário

Um dos maiores desafios no diagnóstico e terapia do cancro com recurso a nanopartículas é conseguir evadir o sistema mononuclear fagocitário. Um dos reguladores dos fagócitos que poderão permitir as nanopartículas evitarem a fagocitose é o ácido siálico (76).

O **ácido siálico** liga-se a receptores imunossupressores **Siglecs** expressos pelas células imunes inatas e ativa um receptor intracelular chamado **ITIM** (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) que medeia sinais inibitórios através de tirosina fosfatases (SHP-1 e SHP-2). O **ácido siálico** é também reconhecido como se fosse um marcador "*self*" pelo fator H (um regulador do sistema do complemento) e inibe a ativação do complemento pela fragmentação C1q/C3b (76). As células tumorais apresentam sobre-expressão de lectinas à sua superfície celular, sendo que algumas têm afinidade para com o ácido siálico (76).

A utilização de marcadores do "self" para uma circulação sistêmica prolongada é uma nova abordagem terapêutica que se tem desenvolvido nos últimos anos. Sabendo isto, Kim *et al.* (2017) desenvolveram AuNPs (nanopartículas de ouro) conjugadas com **ácido siálico** com o objectivo de evitar o sistema fagocitário e atingir melhor as células tumorais. Realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* comparativos com AuNPs não modificadas.

In vitro, as NPs revestidas de ácido siálico facilitaram a inibição da ativação do sistema imunitário e tiveram menos *uptake* pelas linhas celulares de macrófagos (Figura 5.3).

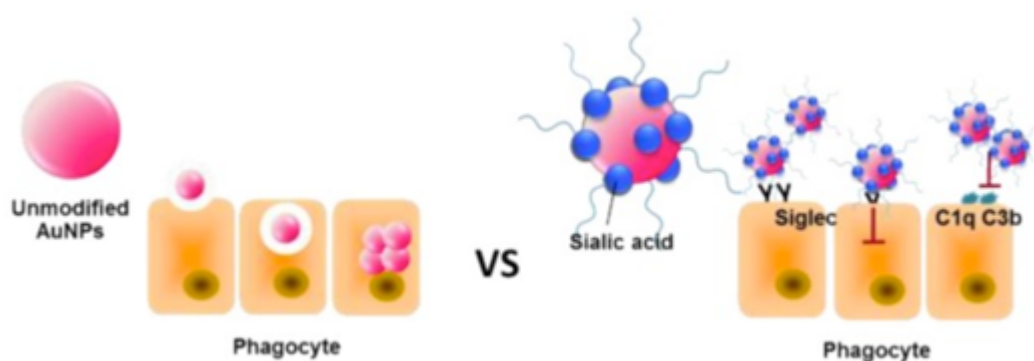


Figura 5.3 Esquema mostrando diferença entre AuNPs não modificadas e AuNPs modificadas com ácido siálico. O ácido siálico impede a fagocitose das AuNPs. (Extraído de Kim, 2017 (76))

Nos ensaios farmacocinéticos *in vivo*, constataram que as NPs conjugadas com ácido siálico vão permanecer mais tempo no sistema circulatório sanguíneo e vão ser capazes de atingir mais especificamente o tumor pela interação com as lectinas sobre-expressas. Apesar de ficarem por maior tempo no sistema circulatório, devido à inibição imunitária, as AuNPs com ácido siálico vão evitar a acumulação em órgãos fagocitários como o baço e o fígado (Figura 5.4). A acumulação no tumor das AuNPs conjugadas ao ácido siálico era duas vezes mais que utilizando AuNPs não-conjugadas. O tratamento com este tipo de nanopartículas inovadoras não mostrou citotoxicidade aparente. (76).

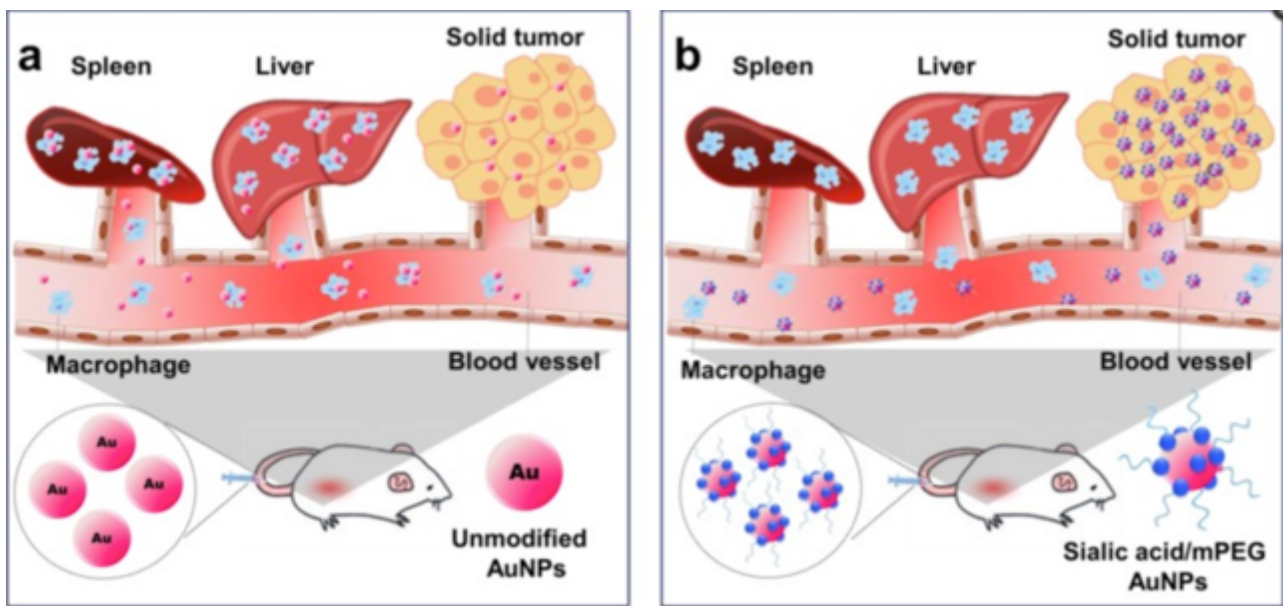


Figura 5.4 Distribuição *in vivo* das AuNPs a) AuNPs não modificadas e b) Modificadas com ácido siálico. a) é fagocitado e apenas uma quantidade pequena chega às células tumorais. b) escapa ao sistema reticuloendotelial e atinge as células tumorais. (Extraído de Kim, 2017 (76))

6 Lectinas encapsuladas em nanopartículas

Para além das suas capacidades como mucoadesivos, as lectinas apresentam atividade antitumoral que vem da sua ativação das vias da apoptose (5). A lectina da *Cratylia mollis* (Cra), que pertence à classe de lectinas que se ligam à manose/glucose, é proveniente das sementes de uma planta do norte do Brasil (*Camaratu bean*). A Cra é um agente **imunomodulador** capaz de induzir repostas pela **Th1 e Th17, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e NO** (77). Esta lectina tem elevada afinidade para tecidos malignos de cancro mamário, uterino e cerebral. No entanto, apresenta uma atividade **citotóxica** contra células Hep-2 e **hepatotoxicidade** (78).

Apesar do potencial antitumoral desta lectina, existe a possibilidade da sua degradação em fluidos biológicos, ação não desejada em outros tecidos e a necessidade de doses frequentes para manter o efeito terapêutico. As nanopartículas, através do efeito de EPR, são capazes de potenciar o efeito da Cra (78).

Andrade *et al.* (2004) estudaram a atividade antitumoral de lipossomas encapsulados com Cra em ratos com Sarcoma-180 (Figura 6.1) (78).

Os tumores sofreram uma redução significativa com tratamentos de Cra. Utilizando os Lipossomas com Cra, correu uma inibição de 71% do Sarcoma 180 implantado. Este valor foi 30% melhor que utilizando Cra livre. O peso dos animais foi também menor após o tratamento com Lipossomas com Cra do que com Cra livre, sugerindo que ocorreu maior redução do tamanho e massa dos tumores (Figura 6.1) (78).

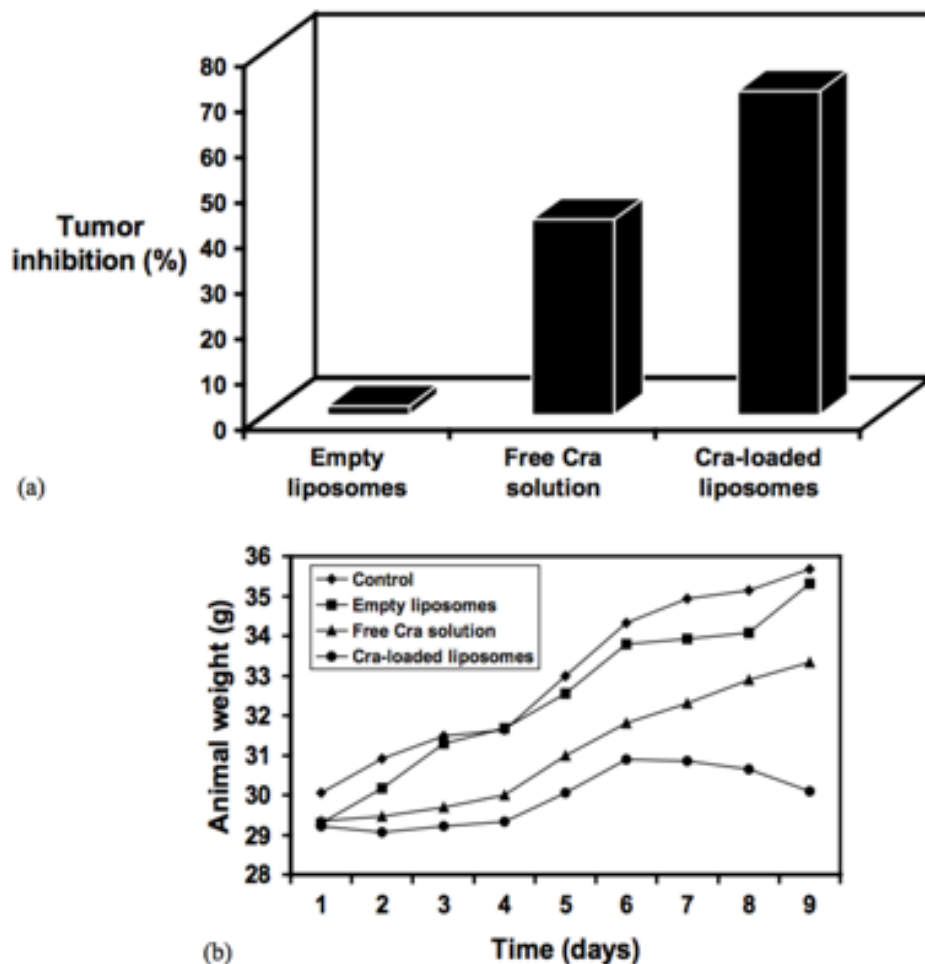


Figura 6.1 Avaliação do efeito de Cra livre em solução e de Lipossomas encapsulados com Cra em ratos com Sarcoma 180. Os regimes de tratamento com Cra livre e com Lipossomas-Cra foram de 7mg/kg cada dia durante 7 dias em 10 animais por grupo. O grupo controlo recebeu uma solução salina e um grupo recebeu lipossomas vazios (sem Cra). A atividade de Cra foi avaliada por a) inibição tumoral comparativamente ao grupo controlo e b) Peso corporal do animal tratado. (Extraído de Andrade, 2004 (78))

Pensa-se que o Cra estimula o sistema imunitário dos animais ao ativar as células envolvidas na imunidade antitumoral.

A hepatotoxicidade do Cra foi avaliada por Andrade *et al.* e não foi detectada nenhuma toxicidade nos animais tratados com Lipossomas com Cra. No entanto, nos animais tratados com Cra livre, foi revelada uma infiltração linfocítica no fígado. Pode-se concluir que o lipossoma reduziu a citotoxicidade e aumentou o efeito terapêutico da lectina (78).

7 Outras aplicações de nanopartículas com interações lectina-hidrato de carbono

Para além das aplicações nas diversas patologias apresentadas anteriormente, a ligação entre lectinas e hidratos de carbono poderá ser explorada para fins de diagnóstico(79–81) ou mesmo como espaçadores em microarranjos (82). Seguem-se alguns exemplos de outras utilizações utilizando nanopartículas.

7.1 Detecção de bactérias

As lectinas começam a ser utilizadas na área de detecção de bactérias patogénicas. A detecção de bactérias é essencial para o controlo de qualidade de comida ou água e é um procedimento essencial em microbiologia clínica (80). O standard para a detecção bacteriana continua a ser a realização de culturas, imunoensaios ELISA, PCR e técnicas microscópicas. Mas, apesar de sensíveis e fiáveis, estes métodos são caros, morosos e requerem bastante trabalho manual (81). Para além disso, estes métodos não são possíveis de ser aplicados para uma detecção geral de patógenos bacterianos sem identificação: são métodos que visam identificar bactérias específicas (80,81). Existem tiras para detecção bacteriana em amostras de urina que funcionam através da redução dos nitritos pelo azoto da bactéria. No entanto, muitas bactérias patogénicas não apresentam atividade redutora de nitritos (80).

Surge então a necessidade de se desenvolverem métodos automáticos e rápidos para a análise inespecífica de bactérias patogénicas (*screening tests*) (81).

Geralmente, as bactérias usam os hidratos de carbono na sua superfície celular para ligação célula-célula e consequente invasão (83). Nos casos apresentados a seguir, essas ligações são exploradas através das lectinas em nanopartículas para obtenção de melhores métodos de detecção.

7.1.1 Biosensores 3D de nanoarranjos de ZnO

Zheng *et al.* (2017) ligaram lectinas **Concanavalina A** (ConA) à superfície de biosensores **ZnO-NR** (*ZnO nanorod arrays*) numa interface nano-3D biológica para a detecção **inespecífica** de bactérias (Figura 7.2). As lectinas **ConA** extraídas da *Canavalia ensiformis* ligam-se à manose e glucose dos polissacáridos presentes na superfície da parede bacteriana e são aqui usadas como o "elemento de reconhecimento" do biosensor 3D (Figura 7.1).

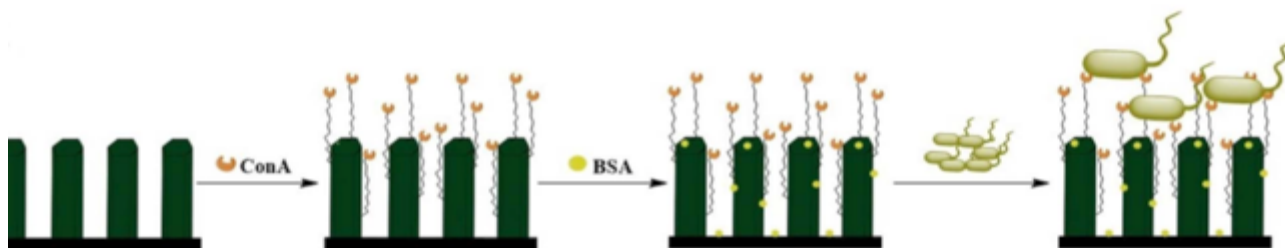


Figura 7.1 Construção e mecanismo de ação do biosensor 3D. O biosensor 3D é conjugado com ConA. Posteriormente, a BSA (Albumina de soro bovino) é adicionada à superfície para inibir as adsorções não-específicas. Após estar preparado, o biosensor é feito reagir com as bactérias, cujos hidratos de carbono se ligam à ConA. A detecção bacteriana é depois feita por microscopia de fluorescência.

(Extraído de Zheng, 2017 (84)).

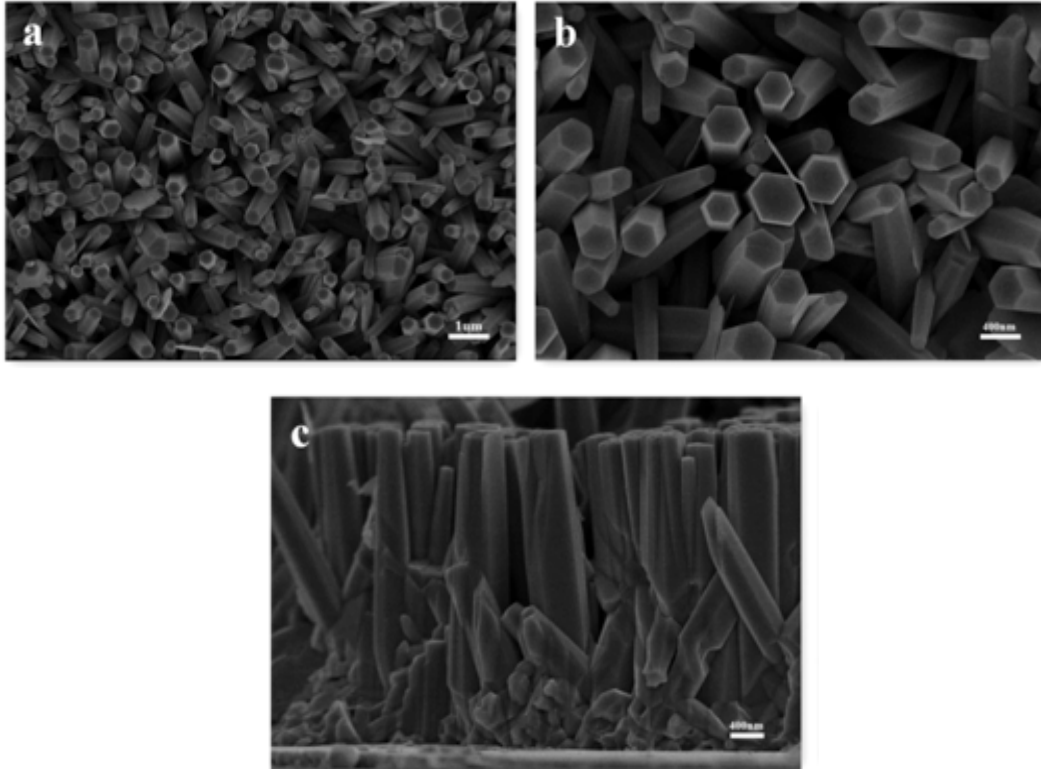


Figura 7.2 Imagens do biosensor ZnO-NR em microscópio de varimento eletrónico. a) e b) correspondem à vista de cima e c) à vista de lado. (Extraído de Zheng, 2017 (84))

As lectinas apresentam neste ensaio uma grande vantagem face aos anticorpos, por terem menor tamanho e uma rápida aglutinação com o hidrato de carbono. As interfaces nano-3D biológicas apresentam uma elevada eficiência de captura face a métodos 2D em que o substrato está numa superfície lisa (Figura 7.2). Foi escolhida a *E.coli* para detecção no modelo experimental do biosensor 3D. O limite de detecção de *E.coli* obtido foi baixo e a gama de detecção da concentração foi elevada (de 1.0×10^3 até 1.0×10^7 cfu/mL). As interfaces nano-3D biológicas mostram assim um grande potencial futuro para análise bacteriana (84).

7.1.2 Detecção inespecífica de bactérias por *microarray* de anticorpos IgGs com AuNP-RCA-ConA

Gao *et al.* (2010) desenvolveram outro método para detecção inespecífica de bactérias que consiste em utilizar um *microarray* de **anticorpos IgGs imobilizados** e, como sondas, **AuNPs** conjugadas com lectinas **RCA** (*Ricinus communis agglutinin*) e **ConA**. A tecnologia de *microarray* é normalmente utilizada para detectar níveis de expressão génica nos pontos microscópicos de DNA presentes no chip (*DNA chip*), genotipagem, mapeamento de DNA, ligação de proteínas, mas recentemente têm-se usado outros tipos de moléculas imobilizadas nas placas. Uma grande vantagem deste tipo de ensaio é poder-se fazer um elevado número de testes em escala pequena e automática (81).

Após a interação das bactérias com o **IgG**, as nanopartículas são ligadas à bactéria. É possível que múltiplas IgGs estejam ligadas a uma só bactéria, o que aumenta a força de ligação. Para amplificar o sinal de leitura óptico, é acrescentado Ag^+ porque as nanopartículas de Au têm uma pobre dispersão de luz devido ao seu tamanho ser inferior a 40nm. Após tudo isto, procede-se à detecção por *resonance light scattering* (RLS) (Figura 7.3) (81).

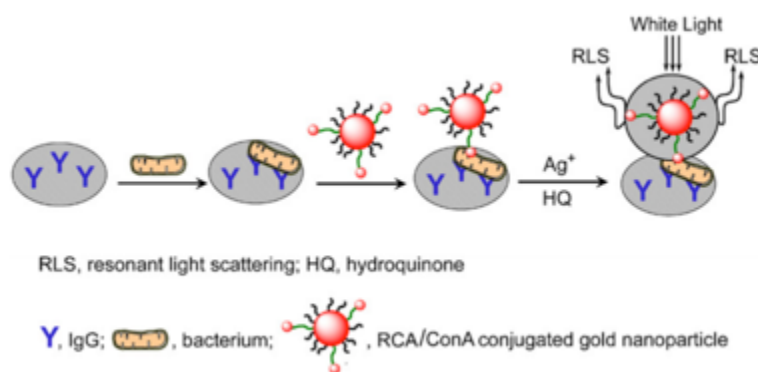


Figura 7.3 Funcionamento do *microarray* com IgG e AuNPs-RCA/ConA.
(Extraído de Gao, 2010 (81))

Esta técnica possibilitou diferenciar bactérias **Gram negativas**, **Gram positivas e fungos**. O tempo necessário para realizar múltiplas análises foi apenas 15 horas e obteve-se um limite de detecção baixo (81).

A lectina ConA liga-se apenas a bactérias Gram-negativas e a RCA liga-se a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Foi possível também detectar as interações de dois antibióticos (amoxicilina e vancomicina) que foram introduzidos em diferentes concentrações no *microarray* com as bactérias: As concentrações crescentes de antibacterianos levavam a menor intensidade de RLS (81).

7.1.3 AuNPs com WGA e LCA com detecção por fotometria

Mikaelyan *et al.* (2017) usaram **WGA** e aglutinina de *Lens culinaris* (**LCA**) em nanopartículas de prata para a detecção de bactérias **Gram-negativas** (*E.coli*) e **Gram-positivas** (*S.aureus*) por ensaios fotométricos (Figura 7.4).

A WGA mostrou a maior sensibilidade entre as duas lectinas: 10^3 células/mL em bactérias Gram-positivas e 3×10^3 células/mL em Gram-negativas. Esta sensibilidade maior para as bactérias Gram-positivas deve-se à composição da sua parede celular que possui uma estrutura proteoglicana espessa constituída em 95% por: mucopéptidos (que contem ácido siálico e *N*-acetilglucosamina), glicopéptidos e mureína.

Os peptidoglicanos apresentam um esqueleto (*backbone*) constituído por ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglucosamina, que são ligandos das lectinas (79). Por isso, as bactérias Gram-positivas apresentam melhor interação com as lectinas (80). As bactérias Gram-negativas apresentam apenas 5-10% de peptidoglicanos na sua parede celular e assim, menores interações com a LCA (79).

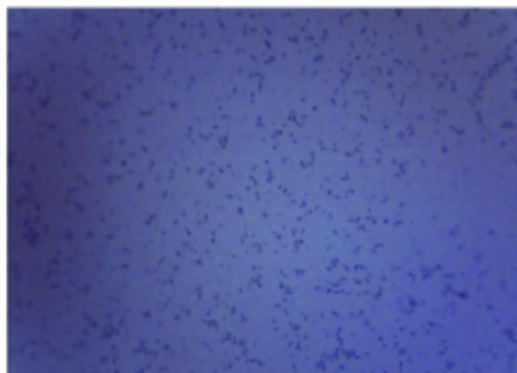


Figura 7.4 Imagem de microscopia electrónica de transmissão. As AgNPs com lectinas agregam após interagirem com a bactéria (*St.aureus*). (Extraído de Mikaelyan, 2017 (80))

7.2 Espaçadores

A imobilização de células inteiras é útil na indústria alimentar, na farmacologia e na biocatálise celular, porque as células apresentam todos os seus co-factores e enzimas intactas. As células livres são instáveis em solução e difíceis de reciclar, o que dificulta a separação e purificação dos produtos obtidos pela catálise. Ao imobilizar a célula inteira, podemos ultrapassar essas limitações ao permitir a sua reutilização e facilitar assim o processo de catálise. No entanto, ainda não se encontrou uma técnica que mantenha ao máximo a integridade da célula com um custo aceitável (82).

Zhuang *et al.* (2017) usaram ConA como espaçador na imobilização de células *E.coli* recombinantes inteiras à superfície de nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 (Figura 7.5). A ConA, ao ter afinidade para os resíduos de mannose da superfície da *E.coli*, facilita a imobilização à nanopartícula magnética. A ConA apresenta boa biocompatibilidade e não afeta a atividade das enzimas celulares, sendo promissor no futuro para uso em catálise celular e como biosensor (82).

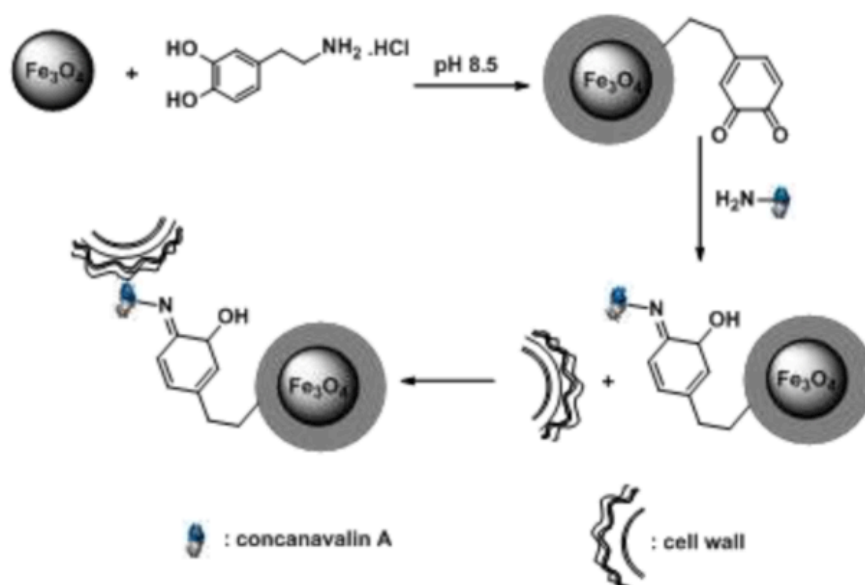


Figura 7.5 Esquema da preparação da matriz e da imobilização celular. Às nanopartículas de Fe_3O_4 foram adicionadas dopamina, pois o grupo funcional residual de quinona da dopamina é reativa para com os grupos nucleofílicos amina da ConA, formando uma ligação covalente. Após a preparação da matriz, ela é feita reagir com a *E.coli*, onde se vai ligar aos seus resíduos de manose. (Extraído de Zhuang, 2017 (82))

8 Toxicologia das nanopartículas

A maior parte dos estudos de investigação envolvendo nanopartículas apenas se focam em obter uma redução da toxicidade do princípio ativo encapsulado, sendo que a possibilidade de ação tóxica por parte do vector não é considerada. Especialmente em nanopartículas que não são degradáveis ou se degradam lentamente, poderá acontecer acumulação de resíduos após o tratamento que desencadeiam toxicidade local ou sistémica (18). Um dos desafios da atualidade é ainda descobrir se existem perigos associados ao uso de nanopartículas, pois há muito pouca informação acerca do assunto.

O tamanho reduzido das nanopartículas potencializa a sua capacidade de atravessar várias barreiras físicas do corpo, sendo que poderão passar a barreira hematoencefálica não propositadamente ou acumularem-se no fígado e baço. A escala nano também permite fácil acesso ao interior das células e de vários compartimentos incluindo o núcleo, podendo dar origem a efeitos nefastos (18).

Os 4 mecanismos possíveis de toxicidade pelos componentes das nanopartículas são:

- Toxicidade química por um dos constituintes da NP que tenha o mesmo mecanismo de ação que o princípio ativo encapsulado.
- Toxicidade devido a produtos de degradação.
- Toxicidade devido à endocitose da nanopartícula.
- Lise da membrana celular (18).

A imunogenicidade de certas lectinas também limita o seu uso como ligandos. Em alguns casos, é possível construir e usar miméticos dessas lectinas para reduzir possíveis efeitos secundários (4).

No futuro, aquando do desenvolvimento de uma nova formulação, deveriam se realizar ensaios adicionais para caracterizar uma possível toxicidade das nanopartículas vazias, bem como estudos de farmacocinética e distribuição (18).

9 Conclusões

Nesta monografia foram abordadas as nanopartículas conjugadas a lectinas e conjugadas a hidratos de carbono. A alta afinidade da ligação lectina-hidrato de carbono melhora significativamente as características das nanopartículas de realizar mucoadesão gastrointestinal e citoadesão às células-alvo. Isto permite uma extensa aplicação em várias doenças, onde se pode usar a ligação lectina-hidrato de carbono para aumentar a absorção intestinal, para dirigir a nanopartícula à sua célula-alvo e para reduzir a dose e/ou tempo de tratamento.

No cancro, a aberração glicómica presente nas superfície das células tumorais apresenta uma ligação com elevada especificidade e afinidade para com as lectinas presentes à superfície das nanopartículas. As nanopartículas revestidas por lectinas são capazes de encontrar as células malignas e se ligarem a elas por ligações glicosídicas, sofrendo endocitose e libertando o fármaco encapsulado para dentro do citosol. Até o fármaco encapsulado chegar ao seu alvo, as nanopartículas conjugadas com lectinas protegem-no do meio enzimático e ácido do trato gastrointestinal, evitando a sua degradação, podendo ainda evitar o sistema mononuclear fagocitário. Deste modo, o fármaco apenas será acumulado nas células-alvo tumorais e não irá causar efeitos citotóxicos nos tecidos saudáveis do corpo, evitando efeitos secundários e toxicidade sistémica. Para além de serem conjugadas a lectinas, as nanopartículas podem também ser conjugadas a hidratos de carbono. Utilizando nanopartículas conjugadas a hidratos de carbono, os seus alvos são as lectinas aberrantes expressas pela células tumorais.

As formulações com nanopartículas conjugadas a lectinas podem ser administradas por várias vias como a intravenosa, oral, intranasal e pulmonar. A barreira hematoencefálica continua a ser uma barreira poderosa à administração de

fármacos com atuação no SNC. No entanto, as nanopartículas conjugadas a lectinas são uma possível solução, escapando à barreira hematoencefálica pela absorção via intranasal.

A ligação glicosídica é também usada em métodos de diagnóstico por ser específica de receptores expressos pelas células malignas e bactérias. O uso de nanopartículas conjugadas a lectinas permite que essa ligação glicosídica seja mais facilmente conseguida, pois o reduzido tamanho e elevada área de superfície das nanopartículas aumenta a capacidade da lectina de se ligar às células-alvo.

As nanopartículas conjugadas com lectinas apresentam uma elevada capacidade de "personalização", havendo um elevado número de nanopartículas, lectinas e ligandos complementares que podem ser utilizados. Isto torna-as uma possível opção de tratamento para muitas patologias para além daquelas aqui abordadas. As perspectivas futuras das nanopartículas conjugadas a lectinas são muito positivas, sendo talvez uma possível concretização do sonho de Paul Ehrlich de finalmente se obter uma "bala mágica".

Referências Bibliográficas

1. Grumezescu AM. Nano- and Microscale Drug Delivery Systems : Design and Fabrication [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 13]. p. 491. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=1366258&site=eds-live>
2. Grumezescu AM. Nano- and microscale drug delivery systems : design and fabrication. 491 p.
3. Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé & P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. 1998;(June):37–41.
4. Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. J Control Release [Internet]. 2016;240:504–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.016>
5. Fu LL, Zhou CC, Yao S, Yu JY, Liu B, Bao JK. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2011;43(10):1442–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>
6. Malekzad H, Mirshekari H, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Baniasadi F, Sharifi Aghdam M, et al. Plant protein-based hydrophobic fine and ultrafine carrier particles in drug delivery systems. Crit Rev Biotechnol [Internet]. 2017;8551(April):1–21. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2017.1312267>
7. Melo-Júnior MR, Telles AMS, Albuquerque FEB, Pontes-Filho NT, Carvalho Jr. LB, Beltrão EIC. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. J Bras Patol e Med Lab [Internet]. 2004;40(2):123–5. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en

8. Bahrami B, Hojjat-Farsangi M, Mohammadi H, Anvari E, Ghalamfarsa G, Yousefi M, et al. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol Lett* [Internet]. 2017;190:64–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>
9. Videira PA. Glycans in Cell Communication What kind of science is Glycoscience? 2009;
10. Gupta GS. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. 2012; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1065-2>
11. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* [Internet]. 2010;63(4):322–9. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2009.071035> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354203>
12. Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem*. 1986;55(June 1985):35–67.
13. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Plant Lectins. *Adv Bot Res*. 2008;48(8):107–209.
14. Wadhwa MS, Rice KG. RECEPTOR MEDIATED GLYCOTARGETING [Review]. *J Drug Target*. 1995;3(2):111–27.
15. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily [Internet]. Vol. 272, *FEBS Journal*. Blackwell Science Ltd; 2005 [cited 2017 Sep 17]. p. 6179–217. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
16. Jones T, Saba N. Nanotechnology and Drug Delivery: An Update in Oncology. *Pharmaceutics* [Internet]. 2011 Apr 14 [cited 2017 Sep 11];3(4):171–85. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4923/3/2/171/>
17. Cisterna BA, Kamaly N, Choi W Il, Tavakkoli A, Farokhzad OC, Vilos C. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine (Lond)* [Internet]. 2016;11(18):2443–56. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529192>
18. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2008 [cited 2017 Sep 6];3(2):133–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18686775>
 19. Yin Y, Chen D, Qiao M, Lu Z, Hu H. Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J Control Release*. 2006;116(3):337–45.
 20. Yattoo MI. Nanotechnology Based Drug Delivery at Cellular Level: a Review. *J Anim Sci Adv* [Internet]. 2014 [cited 2017 Sep 12];4(2):705–9. Available from: www.grjournals.com
 21. Andronescu E, Grumezescu AM. Nanostructures for oral medicine. 2017.
 22. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z (Georgia), Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 [cited 2017 Sep 15];14(5):1310–6. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/5/1310.long>
 23. Banyal S, Malik P, Tuli HS, Mukherjee TK. Advances in nanotechnology for diagnosis and treatment of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(3):289–97.
 24. Kaur M, Garg T, Narang RK. A review of emerging trends in the treatment of tuberculosis. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2016 Feb 17 [cited 2017 Sep 11];44(2):478–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365354>
 25. Alai MS, Lin WJ, Pingale SS. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Sep 11];23(3):351–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949815000356>
 26. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Pr eat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Control Release* [Internet]. 2006 Nov [cited 2017 Sep 13];116(1):1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050027>

27. Jones T, Saba N. Nanotechnology and drug delivery: An update in oncology [Internet]. Vol. 3, *Pharmaceutics. Molecular Diversity Preservation International*; 2011 [cited 2017 Sep 11]. p. 171–85. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4923/3/2/171/>
28. Chen H, Torchilin V, Langer R. Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. *Pharm Res* [Internet]. 1996 Sep [cited 2017 Sep 11];13(9):1378–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893278>
29. Fujii G, Eisenberg D, Selsted ME. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* [Internet]. 1993 Aug [cited 2017 Sep 15];2(8):1301–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401215>
30. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2008;4(4):273–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2008.06.002>
31. Cordon CS, Piva MBR, Melo CM, Pinhal MAS, Suarez ER. Nanoparticles as platforms of molecular delivery in diagnosis and therapy. *OA Cancer* [Internet]. 2013;1(2):6. Available from: <http://www.oapublishinglondon.com/article/986>
32. Sharma A, Sharma S, Khuller GK. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(4):761–6.
33. Letfullin RR. Nanotherapy of cancer by photoelectrons emitted from the surface of nanoparticles exposed to nonionizing ultraviolet radiation. 2017;
34. Nutt MO, Hughes JB, Michael SW. Designing Pd-on-Au bimetallic nanoparticle catalysts for trichloroethene hydrodechlorination. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2017 Sep 12];39(5):1346–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15787376>
35. Ranganathan R, Madanmohan S, Kesavan A, Baskar G, Krishnamoorthy YR, Santosham R, et al. Nanomedicine: Towards development of patient-friendly

- drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1043–60.
36. Kumar A, Chen F, Mozhi A, Zhang X, Zhao Y, Xue X, et al. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. *Nanoscale* [Internet]. 2013;5(18):8307. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3nr01525d>
 37. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2012 Mar 12 [cited 2017 Sep 12];41(7):2971. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15344k>
 38. Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A, Wirth M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. Vol. 56, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004. p. 459–80.
 39. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z (Georgia), Shin DM. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 [cited 2017 Sep 5];14(5). Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/5/1310.long>
 40. Devasena T. *Therapeutic and Diagnostic Nanomaterials*. 2016.
 41. Zhang N, Ping QN, Huang GH, Xu WF. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm*. 2005;294(1–2):247–59.
 42. Ezpeleta I, Arangoa MA, Irache JM, Stainmesse S, Chabenat C, Popineau Y, et al. Preparation of *Ulex europaeus* lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *Int J Pharm*. 1999;191(1):25–32.
 43. Luo YY, Xiong XY, Tian Y, Li ZL, Gong YC, Li YP. A review of biodegradable polymeric systems for oral insulin delivery. *Drug Deliv* [Internet]. 2015;0(0):1–10. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2015.1052863>
 44. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2000 Sep 30 [cited 2017 Sep 11];43(2–3):207–23. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967227>

45. Sharma G, Sharma AR, Nam J-S, Doss GPC, Lee S-S, Chakraborty C. Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2015;13(1):74. Available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/13/1/74>
46. Lavín de Juan L, García Recio V, Jiménez López P, Girbés Juan T, Cordoba-Diaz M, Cordoba-Diaz D. Pharmaceutical applications of lectins. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2017;
47. Gavrovic-Jankulovic M. Drug Delivery: Plant Lectins as Bioadhesive Drug Delivery Systems. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2011;2(December):614–21.
48. Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2017 Sep 11];6:D1321-57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578958>
49. des Rieux A, Pourcelle V, Cani PD, Marchand-Brynaert J, Pr at V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013;65(6):833–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.01.002>
50. Mazzucchelli S, Corsi F. Diabetes management strategies: can nanoparticles be used to therapeutically deliver insulin? 2017;8:49–51.
51. Abu-Dahab R, Sch afer UF, Lehr CM. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: Effect of nebulization on stability and bioadhesion. *Eur J Pharm Sci*. 2001;14(1):37–46.
52. Bar-Zeev M, Livney YD, Assaraf YG. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2017 Sep 13];31:15–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764617300249>
53. Laghari M, Darwis Y, Memon AH, Khan AA, Mohammed I, Abdulbaqi T, et al. Nanoformulations and Clinical Trial Candidates as Probably Effective and Safe Therapy for Tuberculosis. 2016;15(January):201–11.
54. Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. Nanotechnology-Based Approach in

- Tuberculosis Treatment. *Tuberc Res Treat* [Internet]. 2017;2017(Table 1):1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/trt/2017/4920209/>
55. S. Coulibaly F, C. Youan B-B. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Mol Sci* [Internet]. 2017;4(1):1–27. Available from: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/molsci.2017.1.1>
 56. Singh A, Dilnawaz F, Sahoo SK. Long circulating lectin conjugated paclitaxel loaded magnetic nanoparticles: A new theranostic avenue for leukemia therapy. *PLoS One*. 2011;6(11).
 57. Bakker ABH, Van Den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, Van Meijer M, Bia JA, et al. C-type lectin-like molecule-1: A novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2017 Aug 20];64(22):8443–50. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-1659>
 58. Lopes M, Simões S, Veiga F, Seiça R, António Ribeiro. Why most oral insulin formulations do not reach clinical trials *Therapeutic Delivery Oral*. *Ther Deliv* [Internet]. 2016;7(2):117–38. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/tde.15.92>
 59. Kim B, Hyun J, Park K, Kim J. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin – microparticle conjugates in oral insulin delivery system. 2005;102:525–38.
 60. Zhang C, Chen J, Feng C, Shao X, Liu Q, Zhang Q, et al. Intranasal nanoparticles of basic fibroblast growth factor for brain delivery to treat Alzheimer’s disease. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;461(1–2):192–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.049>
 61. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery [Internet]. Vol. 36, *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013 [cited 2017 Sep 11]. p. 437–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609350>
 62. Piazza J, Hoare T, Molinaro L, Terpstra K, Bhandari J, Selvaganapathy PR, et al. Haloperidol-loaded intranasally administered lectin functionalized poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L)-lactic-co-glycolic acid (PEG-PLGA)

- nanoparticles for the treatment of schizophrenia. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2014;87(1):30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.007>
63. Moulari B, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Lectin-decorated nanoparticles enhance binding to the inflamed tissue in experimental colitis. *J Control Release* [Internet]. 2014;188:9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.046>
 64. Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Kazemi B, Allaveisie A, Masoudi A, Daliri K, et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. *Drug Chem Toxicol* [Internet]. 2014;37(4):400–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393043>
 65. Gupta S, sharma P. PLGA-based macrophage-mediated drug targeting for the treatment of visceral leishmaniasis. *Pharm Biomed Res* [Internet]. 2017;3(1):41–7. Available from: <http://pbr.mazums.ac.ir/article-1-158-en.html>
 66. Yin Y, Chen D, Qiao M, Wei X, Hu H. Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J Control Release*. 2007;123(1):27–38.
 67. Jayanthi S, Shanthi S, Vaseeharan B, Gopi N, Govindarajan M, Alharbi NS, et al. Growth inhibition and antibiofilm potential of Ag nanoparticles coated with lectin, an arthropod immune molecule. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;170:208–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.011>
 68. Pang L, Macauley MS, Arlian BM, Nycholat CM, Paulson JC. Encapsulating an Immunosuppressant Enhances Tolerance Induction by Siglec-Engaging Tolerogenic Liposomes. *ChemBioChem*. 2017;18(13):1226–33.
 69. Jain A, Kesharwani P, Garg NK, Jain A, Jain SA, Jain AK, et al. Galactose engineered solid lipid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2015;134:47–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.027>
 70. Vaillant O, Cheikh K El, Warther D, Brevet D, Maynadier M, Bouffard E, et al. Mannose-6-phosphate receptor: A target for theranostics of prostate cancer.

- Angew Chemie - Int Ed. 2015;54(20):5952–6.
71. Saini R, Lee N, Liu K, Poh C. Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2016 Sep 2 [cited 2017 Sep 6];8(9):83. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/8/9/83>
 72. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1998 Jun 17 [cited 2017 Sep 6];90(12):889–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9637138>
 73. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. TIMELINE: Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003 May [cited 2017 Sep 6];3(5):380–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724736>
 74. Pranatharthiharan S, Patel MD, Malshe VC, Pujari V, Gorakshakar A, Madkaikar M, et al. Asialoglycoprotein receptor targeted delivery of doxorubicin nanoparticles for hepatocellular carcinoma. *Drug Deliv* [Internet]. 2017;24(1):20–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2016.1225856>
 75. Muhammad N, Wang X, Wang K, Zhu C, Zhu Z, Jiao Y, et al. Dual-drug loaded nanoformulation with a galactosamine homing moiety for liver-targeted anticancer therapy. *Dalt Trans* [Internet]. 2016;45(33):13169–78. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6DT01434H>
 76. Kim Y-H, Min KH, Wang Z, Kim J, Jacobson O, Huang P, et al. Development of Sialic Acid-coated Nanoparticles for Targeting Cancer and Efficient Evasion of the Immune System. *Theranostics* [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 1];7(4):962–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28382168>
 77. da Cunha CRA, da Silva LCN, Almeida FJF, Ferraz MS, Varejão N, Cartaxo MF de S, et al. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 19];7:1355. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695439>

78. Andrade CA., Correia MT., Coelho LCB., Nascimento SC, Santos-Magalhães NS. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm* [Internet]. 2004 Jul 8 [cited 2017 Sep 13];278(2):435–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196647>
79. Gasparyan VK, Bazukyan IL. Lectin sensitized anisotropic silver nanoparticles for detection of some bacteria. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2013;766:83–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.015>
80. Mikaelyan M V., Poghosyan GG, Hendrickson OD, Dzantiev BB, Gasparyan VK. Wheat germ agglutinin and Lens culinaris agglutinin sensitized anisotropic silver nanoparticles in detection of bacteria: A simple photometric assay. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2017;1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.022>
81. Gao J, Liu C, Liu D, Wang Z, Dong S. Antibody microarray-based strategies for detection of bacteria by lectin-conjugated gold nanoparticle probes. *Talanta*. 2010;81(4–5):1816–20.
82. Zhuang MY, Wang C, Xu MQ, Ling XM, Shen JJ, Zhang YW. Using concanavalinA as a spacer for immobilization of E. coli onto magnetic nanoparticles. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;104:63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.150>
83. Hovhannisyan VA, Bazukyan IL, Gasparyan VK. Application of silver nanoparticles and CdSe quantum dots sensitized with of C-like lectin for detection of St. aureus. Comparison of various approaches. *Talanta* [Internet]. 2017;175:366–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.062>
84. Zheng L, Wan Y, Qi P, Sun Y, Zhang D, Yu L. Lectin functionalized ZnO nanoarrays as a 3D nano-biointerface for bacterial detection. *Talanta* [Internet]. 2017;167(December 2016):600–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.007>
85. Yang X, Wu L, Duan X, Cui L, Luo J, Li G. Adenovirus Carrying Gene Encoding Haliotis discus discus Sialic Acid Binding Lectin Induces Cancer Cell Apoptosis. *Mar Drugs* [Internet]. 2014 Jun 30 [cited 2017 Sep 13];12(7):3994–4004. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24983642>
86. Mo Y, Lim LY. Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *J Control Release* [Internet]. 2005 Sep 20 [cited 2017 Sep 13];107(1):30–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051391>
 87. Mo Y, Lim LY. Mechanistic Study of the Uptake of Wheat Germ Agglutinin-Conjugated PLGA Nanoparticles by A549 Cells. *J Pharm Sci* [Internet]. 2004 Jan [cited 2017 Sep 13];93(1):20–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14648632>
 88. Gao X, Wang T, Wu B, Chen J, Chen J, Yue Y, et al. Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008 Dec 5 [cited 2017 Sep 13];377(1):35–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08018214>
 89. Wang C, Ho PC, Lim LY. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. *Int J Pharm* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2017 Sep 13];400(1–2):201–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804835>
 90. Wang J, Duan T, Sun L, Liu D, Wang Z. Functional gold nanoparticles for studying the interaction of lectin with glycosyl complex on living cellular surfaces. *Anal Biochem* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2017 Sep 13];392(1):77–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481531>
 91. Obaid G, Chambrier I, Cook MJ, Russell DA. Targeting the oncofetal thomsen-friedenreich disaccharide using jacalin-PEG phthalocyanine gold nanoparticles for photodynamic cancer therapy. *Angew Chemie - Int Ed* [Internet]. 2012 Jun 18 [cited 2017 Sep 13];51(25):6158–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201201468>
 92. Seymour LW, Ferry DR, Anderson D, Hesslewood S, Julyan PJ, Poyner R, et al. Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Mar 15 [cited 2017 Sep 13];20(6):1668–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896118>

93. Cho J, Kushiro K, Teramura Y, Takai M. Lectin-Tagged Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Targeting of Sialic Acid on Living Cells. *Biomacromolecules* [Internet]. 2014 Jun 9 [cited 2017 Sep 13];15(6):2012–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm500159r>
94. Kitamura T, Sakuma S, Shimosato M, Higashino H, Masaoka Y, Kataoka M, et al. Specificity of lectin-immobilized fluorescent nanospheres for colorectal tumors in a mouse model which better resembles the clinical disease. *Contrast Media Mol Imaging* [Internet]. 2015 [cited 2017 Sep 13];10(2):135–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976331>
95. Kumar Kk, Reddy Gs, Reddy B, Shekar Pc, Sumanthi J, Chandra KIP. Biological role of lectins: A review. *J Orofac Sci* [Internet]. 2012;4(1):20. Available from: <http://www.jofs.in/text.asp?2012/4/1/20/99883>

A1. Apoptose

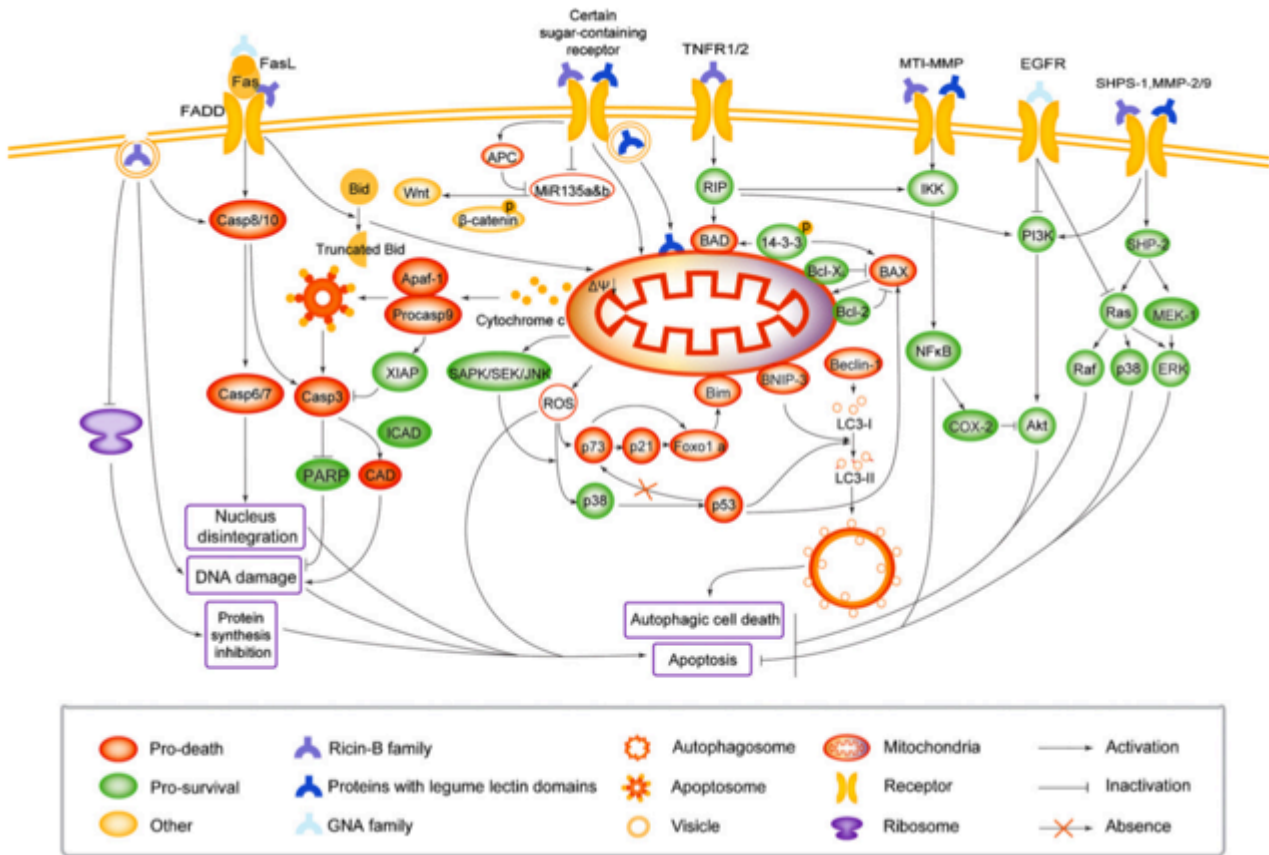


Figura A1. Indução de apoptose nas células cancerígenas pelas lectinas de plantas.
(Extraído de Fu, 2011 (5))

A2. Lectinas Tipo C

Tabela A2. Subgrupos das lectinas Tipo C.
(Adaptado de Zelensky, 2005 (15))

Grupo	Nome	Domínios associados
I	Lecticanos	<i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF), Sushi, Ig e Link
II	Asialoglicoproteína e receptores DC	Nenhum
III	Colectinas	Nenhum
IV	Selectinas	Sushi e EGF
V	Receptores das células NK	Nenhum
VI	Multi-CTLD endocytic receptors	FnII e Ricina
VII	Grupo Reg	Nenhum
VIII	CHODL, LAYN	Nenhum
IX	Tetranectina	Nenhum
X	Policistina	WSC, REJ, PKD
XI	Atractina	PSI, EGF CUB
XII	EMBP	Nenhum
XIII	DGCR2	Nenhum
XIV	Trombomodulina, CD93, CD248	EGF
XV	Bimlec	Nenhum
XVI	SEEC	SCP e EGF
XVII	CBCP/Frem1/QBRICK	Repetições CSPG e domínio CalX- β

A3. Nanoformulações

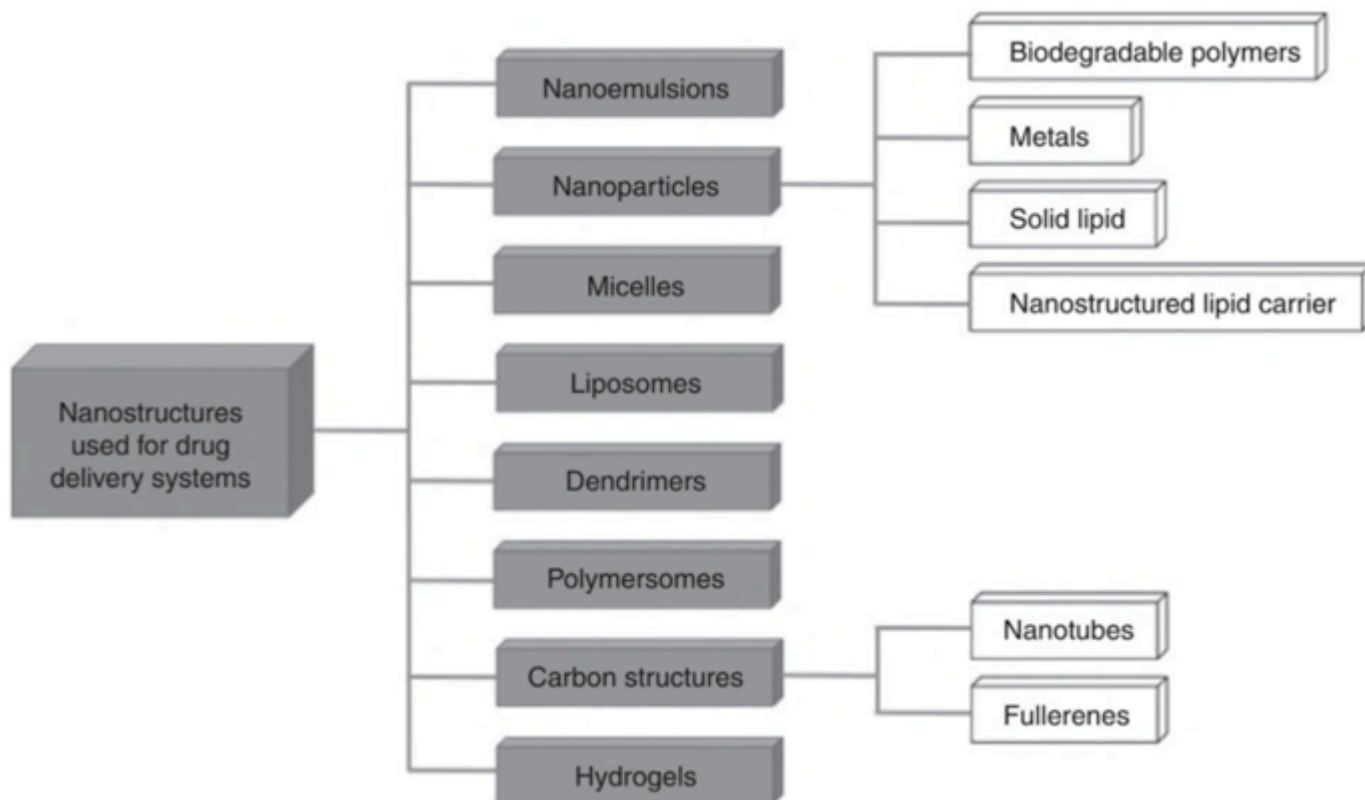


Figura A3. Diagrama dos principais tipos de nanoestruturas utilizadas como sistemas de entrega de fármacos.

(Extraído de Andronescu, 2007 (21))

A4. TP5

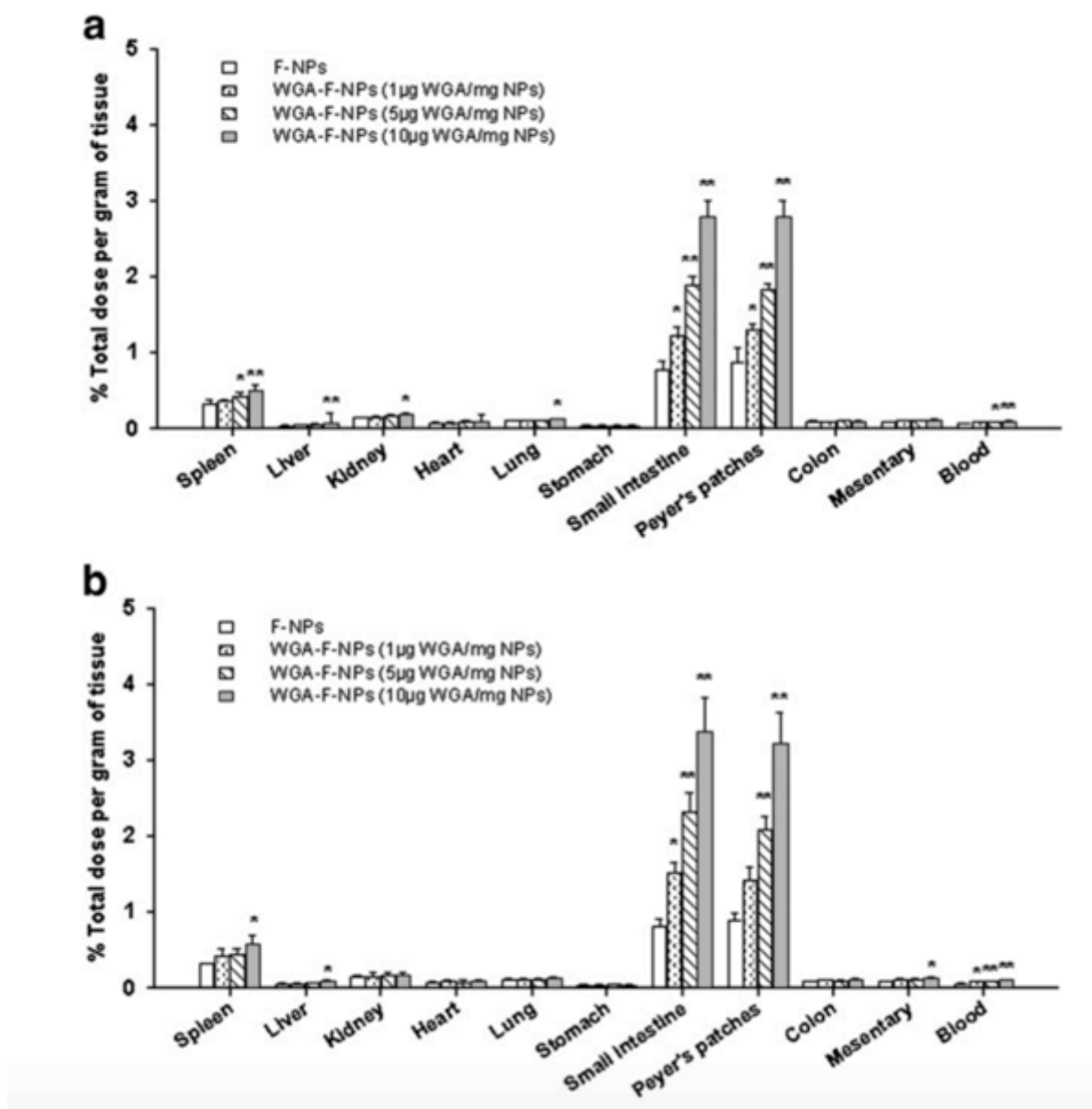


Figura A4. Distribuição *in vivo* em tecidos de rato, das nanopartículas de PLGA com TP5 com e sem conjugação à WGA. a) após uma única toma oral b) administração diária durante 7 dias. A quantidade de nanopartículas fluorescentes em cada tecido foi determinada e a percentagem relativa foi calculada em comparação com a quantidade total de nanopartículas administradas, que constituiu 100%. As percentagens foram depois divididas pelo peso das amostras de tecido individuais para compensar variações entre animais. F-NPs: TP5 em PLGA. WGA-F-NPs: TP5 em PLGA conjugado a WGA. Foram criadas 3 formulações com concentrações de WGA diferentes (1µg WGA/mg NPs, 5µg WGA/mg NPs e 10µg WGA/mg NPs). (Extraído de Yin, 2007 (66))

A5. Leucemia

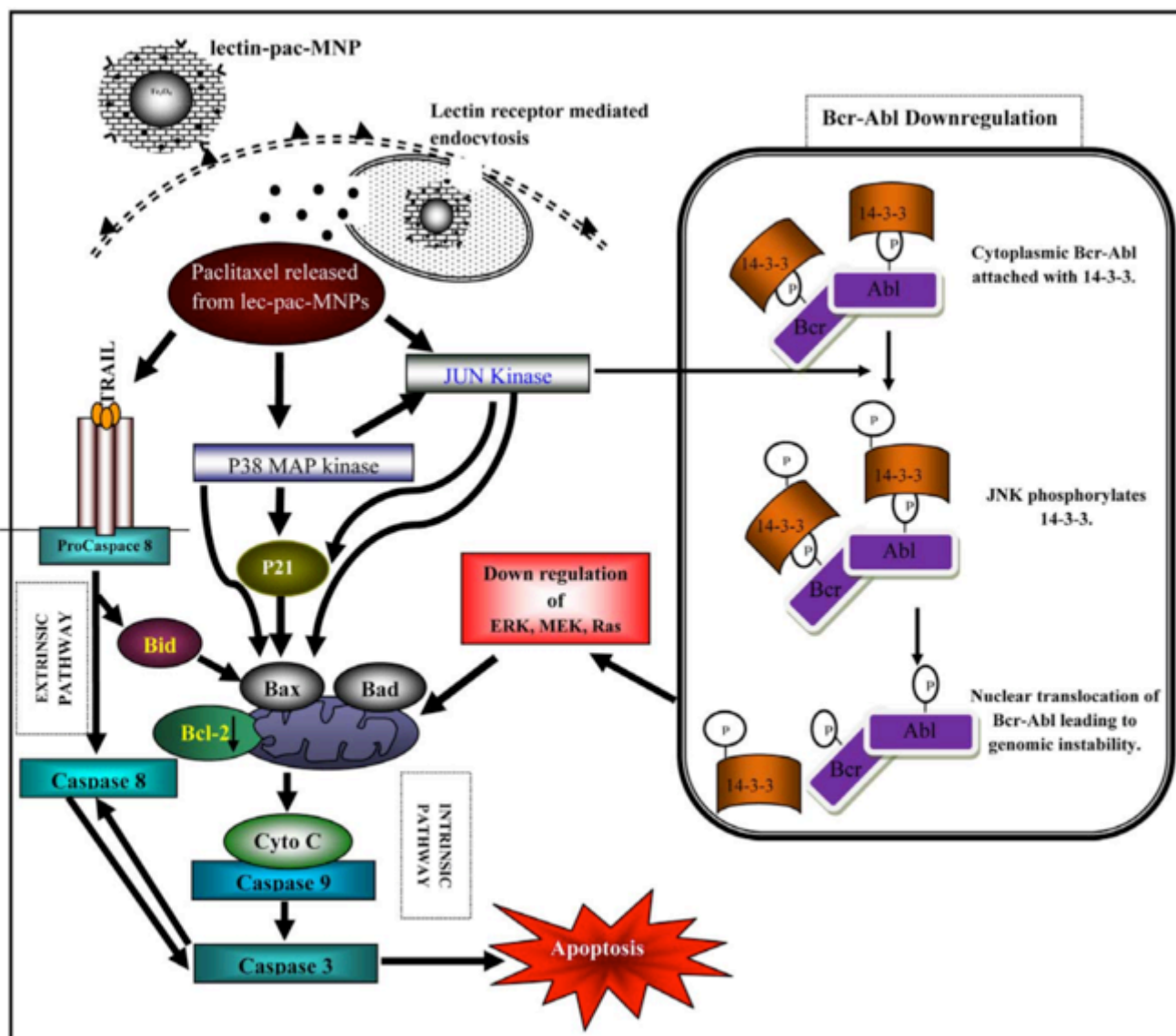


Figura A5. Esquema dos eventos ocorridos após endocitose das lec-pac-MNPs e do mecanismo de ação do paclitaxel após a sua liberação da nanoformulação. (Extraído de Singh, 2011 (56))

A6. Cancro

Tabela A6. Várias nanoformulações com lectinas ou hidratos de carbono que foram utilizadas no tratamento de cancro.

(Adaptado de Coulibaly, 2017 (55))

Tipo de nanoformulação	Lectina/ monossacárido	Alvo (Glicano ou lectina)	Tipo de cancro	Referência
Lipossoma	Cra (Lectina da <i>Cratylia mollis</i>)	Manose, glucose	Sarcoma (180)	(78)
Terapia génica (Adenovirus)	HddSBL (<i>Haliotis discus discus sialic acid binding lectin</i>)	Ácido siálico	Carcinoma hepatocelular (Hep3B), cancro do pulmão (A549, H1299)	(85)
Nanopartículas WGA-IPM-PLGA	<i>Wheat germ agglutinin</i> (WGA)	Ácido siálico N-acetil glucosamina	Cancro do pulmão (A549 e H1299)	(86,87)
Nanopartículas WGA-PEG	<i>Wheat germ agglutinin</i> (WGA)	Ácido siálico e N-acetil glucosamina	Cancro do cólon (Caco-2 e HT-29)	(88,89)
Nanopartículas RCA-Au	<i>Ricinus communis agglutinin</i> (RCA)	Galactose	Cancro cervical (HeLa)	(90)
Nanopartículas Jacalina-Peg-Au	Jacalina	Thomsen-Friedenreich	Cancro do cólon (HT-29)	(91)
Polimero de doxorubicina com galactosamina (PK2)	Galactosamina	Lectina hepática (ASGPR)	Cancro hepático	(92)
<i>SNA-tagged fluorescent polymeric nanoparticles</i>	<i>Sambucus Nigra agglutinin</i> (SNA)	α 2-6-ácido siálico	Cancro cervical (HeLa) cancro da mama (MCF-7)	(93)
PNA immobilizada	<i>Peanut agglutinin</i> (PNA)	Antigénio Thomsen-Friedenreich	adenocarcinoma colorectal (HT-29, HCT-116, e LS174T)	(94)
Nanopartículas magnéticas com paclitaxel e lectinas	Não especificada	Moléculas semelhantes às lectinas tipo C humanas-1	Leucemia mieloide crónica (K562)	(56)

A7. Lectinas animais

Tabela A7. Classificação das lectinas animais. (Adaptado de Kumar, 2012 (95))

Família de Lectinas	Sacárido ligando mais típico	Localização subcelular	Exemplos de funções
Calnexina	Glc ₁ Man ₉	Reticulo endoplasmático (RE)	Processamento proteico no RE
Lectinas tipo M	Man ₈	RE	Degradação de glicoproteínas no RE
Lectinas tipo L	Vários	RE, <i>ER-Golgi intermediate compartment</i> (ERGIC), Golgi	Processamento proteico no RE
Lectinas tipo P	Manose-6-fosfato, entre outros	Via secretória	Processamento de proteínas pós-Golgi, degradação de glicoproteínas no RE
Lectinas tipo C	Vários	Membrana celular, extracelular	Adesão celular (Selectinas), <i>clearance</i> de glicoproteínas, imunidade inata (colectinas)
Galectinas	β-Galactosidos	Citoplasma, extracelular	<i>crosslinking</i> de glicanos na matriz extracelular
Lectinas tipo I (Siglecs)	Ácido siálico	Membrana celular	Adesão celular
Lectinas tipo R	Vários	Membrana celular, Golgi	<i>Turnover</i> de glicoproteínas hormonais. Dirigidas a enzimas
Lectinas tipo F	GlcNAc ₂	Citoplasma	Degradação de glicoproteínas <i>misfolded</i>
Ficolinas	GlcNAc, GalNAc	Membrana celular, extracelular	Imunidade inata
Lectinas tipo Quitinase	Quito-oligosacáridos	Extracelular	Metabolismo do colagénio (YKL-40)
Lectinas tipo F	Oligosacáridos com terminal -Fuc	Extracelular	Imunidade inata
Intelectinas	Gal, galactofuranose, pentoses	Membrana celular/extracelular	Imunidade inata. Fertilização e embriogénese