

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Nanopartículas como sistemas transportadores de proteínas

José Miguel Columbano Madeira

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2020

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Nanopartículas como sistemas transportadores de proteínas

José Miguel Columbano Madeira

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

**Orientadora: Investigadora Principal, Professora Doutora
Lídia Maria Diogo Gonçalves**

2020

Resumo

Desde a introdução da insulina no mercado que as terapias à base de proteínas têm sido alvo de estudo e desenvolvimento em áreas e doenças, como a oncologia, doenças cardiovasculares, doenças metabólicas e infecciosas. Estes agentes terapêuticos são biomacromoléculas de grandes dimensões, com parâmetros de estabilidade estreitos e com conformações estruturais que lhes conferem especificidade no seu modo de acção e também problemas na sua administração. Fenómenos como a baixa biodisponibilidade devido à degradação enzimática ou imunogenicidade ou à baixa internalização nas células são as grandes razões para a dificuldade da aplicação desta classe terapêutica. A Aplicação de sistemas de veiculação de fármacos (Drug Delivery Systems, DDS) com recurso à nanotecnologia, tem sido uma estratégia para a administração de proteínas. Estes sistemas são transportadores biocompatíveis e biodegradáveis existentes à escala nanométrica que transportam o fármaco, ao local de acção de forma seletiva através da aplicação de ligandos específicos e protegem o mesmo durante o transporte, de modo a evitar a degradação ou desnaturação da proteína, levando a uma libertação prolongada no local de acção.

Existem vários tipos de nanopartículas com aplicações e especificidades diferentes que dependem da sua composição e das propriedades como o tamanho, formato, hidrofobicidade e potencial zeta. Estas propriedades são controladas durante a produção do nanotransportador de forma a que a nanopartícula seja a mais adequada ao fármaco. Enquanto na sua constituição estão presentes materiais à escala nanométrica, como os lípidos, os polímeros ou materiais inorgânicos como, por exemplo, a sílica. A aplicação desta tecnologia na administração de proteínas e péptidos terapêuticos tem alcançado resultados promissores, tais como o aumento da biodisponibilidade e da semivida das proteínas em diversos estudos. Atualmente já foram introduzidos no mercado vários medicamentos à base de proteínas recombinadas na qual é aplicada a nanotecnologia nos seus sistemas de veiculação de fármacos.

Palavras-chave: Proteínas, nanotransportador, sistema de veiculação de fármacos, especificidade, nanopartículas.

Abstract

Since the introduction of insulin on the market, protein-based therapies have been the target of study and development, to be used in diseases, such as cancer and cardiovascular, metabolic and infectious diseases. These therapeutic agents are large biomacromolecules with narrow stability parameters and structural conformations that confers specificity to the binding site and difficulties in its administration. Phenomena such as low bioavailability due to enzymatic degradation or immunogenicity or low level of cell internalization are the main reasons for the difficulties in applying this therapeutic class. The use of drug delivery systems (DDS) through the application of nanotechnology, the use of drug delivery systems (DDS) has been a strategy for the administration of proteins. These systems are biocompatible and biodegradable transporters that exist in the scale of nanometers and are used in the selectived delivery of the drug to the action site by applying targeting ligands to their surface. These systems also protect the drug from possible degradation or denaturation during the transport, thus contributing to a prolonged release at the site of action.

There are several types of nanoparticles with different applications and specificities which are dependent on their nanomaterial and properties such as size, shape, hidrophobicity and zeta potential. These properties are controlled during the production of the nanotransporter, with the aim to make the nanoparticle suitable for the intended drug. While in its constitution there are materials, such as lipids, polymers, or inorganic materials such as silica. The application of this technology for the administration of therapeutic proteins and peptides has achieved promising results, such as increased bioavailability and half-life of the drug in circulation in several studies. In the modern days, several drugs based on recombinant proteins have been introduced on the market, in which nanotechnology in applied in their drug delivery systems.

Keywords: Protein, nanocarrier, delivery drug system, specificity, nanoparticles

Índice de Figuras

Figura 1: Nanocápsulas e nanoesferas. Adaptado de Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas L de L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quim Nova. 2003;26(5):726–37.

Abreviaturas

ADA:	Adenosina Deaminase
AgNPs:	Nanopartículas de prata
AuNP:	Nanopartículas de ouro
BMP2:	Bone morphogenetic protein 2
CZP:	Certolizumab pegol
DDS:	Drug Delivery System
EMA:	European Medicines Agency
FDA:	United States Food and Drug Administration
GAG:	Glicoaminoglicanos
GNR:	Gold nanorods
IgA:	Imunoglobulina A
LDH:	Lactato Desidrogenase
LUV:	Large Unilamellar Vesicle
MLV:	Multilamellar Vesicle
MNP:	Nanopartículas Magnéticas
MSN:	Nanopartículas de Sílica Mesoporosa
NLC:	Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
NPPs:	Nanopartículas Poliméricas
NPs:	Nanopartículas
NTs:	Nanotransportadores
PEG:	Polietilenoglicol
PGA:	Ácido Poliglicólico
PLA:	Ácido Polilático
PLGA:	Ácido Polilático-co-glicólico
PMMA:	Polimetilmetacrilato
RES:	Sistema Reticuloendotelial
ROS:	Espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species)
SA:	Substância Activa
SLN:	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
SPIONs:	Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas
SUV:	Small Unilamellar Vesicle
VIP:	Vasoactive intestinal polypeptide
VLP:	Virus-like Particle
VNP:	Virus-based Nanoparticles

Índice

Resumo	2
Abstract.....	3
Índice de Figuras	4
Abreviaturas	5
Introdução	7
Métodos	8
Resultados	9
1. Nanotransportador.....	9
1.1 Definição.....	9
1.2 Caraterísticas farmacocinéticas.....	9
1.3 Propriedades caraterísticas	10
1.3.1 Tamanho e formato	10
1.3.2 Potencial zeta e perfil lipídico	11
1.3.3 Ligandos específicos do local de ação	12
1.4 Tipos de nanotransportadores	13
1.4.1 Transportadores Lipídicos	13
1.4.1.1 Lipossomas.....	13
1.4.1.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas – SLNs.....	14
1.4.1.3 Transportadores Lipídicos Nanoestruturados – NLCs	15
1.4.2 Nanopartículas Poliméricas -NPPs	15
1.4.3 Nanopartículas Virais- VNPs e VLPs.....	17
1.4.4 Nanopartículas Inorgânicas	18
1.4.4.1 Nanopartículas metálicas à base de ouro – AuNPs	18
1.4.4.2 Nanopartículas Magnéticas – MNP	19
1.4.4.3 Nanopartículas de Sílica Mesoporosa – MSN	20
1.4.4.4 Hidroxiapatite	21
1.5 Toxicidade	22
2. Aplicação de nanopartículas em terapias à base de proteínas.....	24
2.1 Anticorpos.....	24
2.2 Citoquinas	24
2.3 Enzimas.....	25
2.4 Fatores de crescimento	25
3. Prospetivas para o futuro	27
Conclusão	29
Referências bibliográficas	30

Introdução

Os peptídeos e proteínas terapêuticas, classificados como produtos biofarmacêuticos, são proteínas que deveriam ser produzidas pelo organismo, mas que por motivos patológicos não são sintetizadas naturalmente ou em quantidade insuficiente. (1) O uso deste tipo de terapias apresenta inúmeras vantagens, como a alta especificidade, seletividade e capacidade de ação potente e efetiva sobre funções do organismo. Desta forma, destacam-se como fármacos de primeira escolha comparativamente aos fármacos convencionais de origem química, criando uma baixa probabilidade de interferência com outros processos biológicos naturais. (2)

Com a evolução de tecnologias de DNA recombinante e o desenvolvimento de áreas como a biotecnologia e bioengenharia ocorreu um grande impacto na produção em larga escala de biomoléculas com uso terapêutico, e um melhor conhecimento da função das proteínas reguladoras na fisiopatologia das doenças. (1) A insulina, por exemplo, foi a primeira proteína introduzida no mercado em 1923, como um fármaco de elevada importância no tratamento da *Diabetes Mellitus* da qual o seu processo de produção é alvo de inovações contínuas. (3) Muitas biomoléculas, devido à sua capacidade, acabaram por se tornar fármacos de eleição para um elevado número de patologias; como por exemplo, a hemofilia (fatores de coagulação sanguínea), a anemia (eritropoietina), a fibrose cística (enzimas e fatores de crescimento), cancro (anticorpos monoclonais e interferões) e doenças metabólicas. (4) (5) (6)

No entanto, com o aumento da utilização destes agentes terapêuticos foram levantados novos desafios relativos ao seu transporte devido as propriedades físico-químicas específicas das proteínas, como: o elevado tamanho molecular, a baixa estabilidade em pH baixo, a suscetibilidade a degradação enzimática, imunogenicidade, semivida baixa em ambiente plasmático e a tendência de sofrer agregação, adsorção e desnaturação. (2) Na administração oral, por exemplo, a degradação por parte de enzimas gastrointestinais e a baixa penetração da membrana intestinal induz a baixa biodisponibilidade de moléculas biológicas. Por outro lado, a via parentérica que é a via de administração mais usada para proteínas, está associada a redução na adesão à terapêutica por parte dos doentes crónicos, uma vez que devido à curta semivida das proteínas este tipo de administração implica várias injeções ao longo do dia, o que torna a terapêutica incómoda para o doente. (7) (8) Existem ainda fenómenos que, independentemente do meio de administração, não permitem a absorção das proteínas e a internalização nas células-alvo. A difusão de moléculas de grandes dimensões, como as proteínas terapêuticas, pelas membranas epiteliais é geralmente lenta o que resulta numa baixa absorção para a circulação sanguínea, a não ser que sejam usados transportadores específicos. (8) Com todas estas limitações em conta, os principais objetivos de inovação

nesta classe de fármacos é proteger e direcionar a molécula terapêutica durante o seu percurso até ao local de ação.

Os sistemas de transporte de moléculas têm sido alvo de investigação considerável nas últimas décadas, sendo as nanopartículas (NPs) um sistema particular de transporte que usa as propriedades físicas das partículas para melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de vários tipos de moléculas através da encapsulação ou adsorção das mesmas a uma matriz biocompatível. (9)

A aplicação deste tipo de sistemas de transporte pretende estabilizar as proteínas num ambiente biológico específico para ultrapassar as barreiras fisiológicas e chegar ao tecido-alvo, de forma a que a proteína possa exercer a sua função terapêutica.

Com foco nas adversidades da administração de proteínas, iremos abordar nesta revisão os vários sistemas de NPs usados nesta classe terapêutica, destacando os conceitos fundamentais para a sua eficiência.

Métodos

Os métodos usados na redação desta monografia foram métodos de pesquisa e análise de artigos científicos e livros relacionados com a área, obtidos em plataformas como: PubMed, Elsevier, NCBI, EMA, entre outros. O início da pesquisa incidiu sobre o uso de proteínas como terapia, seguido da pesquisa sobre sistema de veiculação de fármacos e a sua aplicação em proteínas. A pesquisa foi executada com o uso de termos, como: *“nanocarrier”*, *“therapeutic protein”*, *“therapeutic peptides”*, *“nanoparticle”*, *“drug”*, *“delivery”*, etc...

Também foi executada uma revisão e leitura da bibliografia dos artigos consultados, de forma a obter uma melhor compreensão do tema em estudo.

Resultados

1. Nanotransportador

1.1 Definição

O termo nanotransportador (NT) refere-se a um material, ou a uma dispersão de partículas, cujo tamanho varia entre 1nm e 1000nm numa dimensão. Na sua aplicação nos cuidados de saúde, os NTs são usados como sistemas de libertação controlada de fármacos, em que estes podem ser dissolvidos, aprisionados, encapsulados ou ligados à matriz do NT durante a formulação das partículas.

Na comparação da aplicação de um fármaco isolado com um fármaco encapsulado, um fármaco tradicional com boas propriedades de distribuição terá uma baixa concentração no local de ação resultando numa baixa eficiência, tornando necessário a administração de doses mais elevadas, o que aumenta o risco de desenvolvimento de efeitos secundários. Determinados agentes terapêuticos, ainda que demonstrando sucesso em culturas celulares, falham na reprodução do mesmo resultado *in vivo* pela dificuldade em limitar a zona de ação do agente terapêutico à área designada. (10) Neste contexto, a utilização de sistemas de transporte de fármacos permite a alteração das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das moléculas a serem transportadas, de forma a que o transporte para o local de ação seja acelerado, prolongando o tempo do efeito terapêutico do fármaco e reduzindo os efeitos secundários. Isto deve-se à distribuição do fármaco ser direcionada para os tecidos-alvo e da libertação do fármaco ser controlada (alcançando uma maior eficiência terapêutica), permitindo uma redução na dosagem do transportador e do fármaco comparativamente ao fármaco livre, o que consequentemente diminui a sua toxicidade. (8)

1.2 Características farmacocinéticas

Os sistemas de veiculação de fármacos possuem parâmetros que são cruciais para a penetração na célula e para o desempenho da sua função. As NPs penetram na célula através de mecanismos, como a endocitose e pinocitose. (11) A internalização das NPs pelas células é dependente das suas propriedades, como o tamanho, o formato, a carga e o carácter hidrofílico à superfície. (12) No entanto, durante o período da circulação sanguínea, proteínas plasmáticas como a albumina sérica, imunoglobulinas e outras

apolipoproteínas são adsorvidas à superfície da NP, promovendo o processo de opsonização. As NPs estimulam a resposta imunitária, sendo a opsonização induzida em resposta à ativação do sistema imunitário. Este processo permite a ligação de imunoglobulinas à sua superfície, sendo a partícula reconhecida e alvo de remoção por parte dos macrófagos do sistema reticuloendotelial (RES). (13) A “coroa proteica”, criada pela opsonização das proteínas plasmáticas, define a natureza fisiológica do transportador, sendo dependente do tamanho da partícula, formato, potencial zeta, hidrofobicidade e funcionalidades da superfície, tais como, por exemplo, ligandos específicos para tecidos-alvo. (13)

Quando a célula é exposta às NPs, é natural que ocorra uma interação entre o complexo nanopartícula-coroa biomolecular e os componentes da membrana celular. Esta interação é seguida da ativação de um processo de internalização das NPs na célula, que é dependente de energia. (12) Para aplicações terapêuticas das NPs, é necessário que os biomateriais da partícula sejam biocompatíveis, ou seja, que o material realize a sua função desejada no que respeita à terapêutica sem causar efeitos locais ou sistêmicos indesejados no paciente, e que o seu tempo de circulação sanguínea seja prolongado. (11) (14)

1.3 Propriedades características

1.3.1 Tamanho e formato

O tamanho e o formato das NPs são fatores condicionantes na distribuição e interação com as células e assim como do tempo de circulação no sangue, pois influenciam diretamente a área superficial em contato com o local de ação, assim como a sua estabilidade durante a circulação sanguínea. Assim, o tamanho de uma NP ideal deverá oscilar entre 1 e 100nm, embora partículas até 200 nm ainda sejam consideradas NPs com uma internalização celular aceitável. (15) Partículas que apresentem dimensões maiores quando em circulação acabam por ser retidas e fagocitadas pelo RES, enquanto partículas menores apresentam maior probabilidade de serem excretadas pelo sistema renal (13)(15)(16). O formato das NPs influencia o seu comportamento cinético na circulação sanguínea de baixo calibre, o seu tempo de circulação e a sua adesão à parede do vaso, sendo que o formato não-esférico é preferencial a outros. (18) (19) As partículas precisam de sofrer o efeito da marginação, que afeta os glóbulos vermelhos, para se ligarem ao endotélio e saírem da circulação sanguínea para os locais de ação. (17) (18) (20)

1.3.2 Potencial zeta e perfil lipídico

O potencial zeta de uma NP é usado para caracterizar a carga superficial da mesma. Esta propriedade reflete o potencial elétrico da NP e é influenciado pela sua composição e pelo meio em as NPs estão dispersas. Nanopartículas com um potencial zeta abaixo de 30mv demonstraram estabilidade em suspensão, uma vez que a carga superficial previne a sua agregação. (9) A carga à superfície da NP tem influência no processo de opsonização, afetando a adsorção de proteínas plasmáticas. De acordo com Gessner et al (21), num estudo envolvendo várias séries de nanopartículas poliméricas (NPPs) com diferentes cargas superficiais, observou-se que NPs com maior carga negativa resultam numa maior adsorção de proteínas plasmáticas. Foi também demonstrado que a carga de uma partícula tem influência na biodistribuição e circulação sanguínea, sendo que as NPs com maior densidade de carga superficial sofrem uma maior depuração no sangue e captura pelo RES, enquanto partículas com carga neutra têm um tempo de circulação sanguínea longo com baixa depuração pelo RES. Partículas com carga positiva apresentam um menor tempo de circulação no sangue quando comparadas com partículas de carga inferior, sendo que ocorre uma maior acumulação no fígado e baço do que com as partículas de carga negativa. (13)

O caráter hidrofóbico da NP não influencia apenas a opsonização, como também determina a farmacocinética e a biodistribuição da mesma. Nanopartículas com uma superfície mais hidrofóbica tendem a adsorver mais proteínas plasmáticas à sua superfície após administração *in vivo*. (22) A ligação destas opsoninas à superfície das NPs atua como uma ponte entre a NP e os agentes fagocitários, aumentando assim a depuração sanguínea e uma captura pelo RES muito mais rápida. (9) (22) Com o objetivo de reduzir a taxa de remoção das NPs pelo RES, a diminuição do perfil hidrofóbico superficial da partícula foi alvo de pesquisa. Uma das abordagens mais promissoras foi a associação de polímeros hidrofílicos à superfície da partícula. Polímeros como polietilenoglicol (PEG), polioxietileno, poloxamina, quitosano, dextrano, entre outros, já demonstraram serem polímeros de interesse. O PEG é um polímero inerte e hidrofílico, sem carga que tem sido alvo de inúmeras pesquisas de modo a mascarar o perfil hidrofóbico da superfície das NPs e torná-los indetetáveis ao sistema imunitário. A adição de polímeros PEG à superfície das NPs mostrou ter efeitos no aumento do tempo da circulação, através da capacidade de mascarar a carga da superfície e o seu perfil hidrofóbico, impedindo o processo de opsonização. (9)(13)(23)

1.3.3 Ligandos específicos do local de ação

A especificidade ativa da NP para o local de ação no corpo é dependente da interação específica dos ligandos à sua superfície com os receptores membranares das células no local de ação. Esta estratégia permite o direcionamento da NP para os locais-alvo, assim como uma redução dos efeitos secundários, uma vez que as células saudáveis não possuem o receptor-alvo específico para o ligando da NP, reduzindo a sua distribuição. Esta estratégia revelou os melhores resultados na terapia antitumoral, especialmente na cura de tumores localizados ou nas primeiras fases de desenvolvimento.(24)

Os potenciais ligandos podem ser anticorpos inteiros ou fragmentos de anticorpos, aptmeros, péptidos, proteínas como a transferrina, hormonas, glicoproteínas.

1.4 Tipos de Nanotransportadores

1.4.1 Transportadores lipídicos

1.4.1.1 Lipossomas

Lipossomas são vesículas com uma bicamada lipídica concêntrica, composta maioritariamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, na qual um ou mais volumes aquosos estão confinados. Os lipossomas são caracterizados pelo tamanho, carga superficial e número de bicamadas. (10) (25) Este tipo de transportadores apresenta várias vantagens, nomeadamente: a sua natureza anfílica que se traduz na sua capacidade de poder incorporar na sua constituição fármacos de carácter hidrofílico e hidrofóbico, a biocompatibilidade, facilidade na alteração da superfície do transportador e o facto de não serem imunogénicas. É possível alterar a permeabilidade membranar do lipossoma através da alteração da composição dos fosfolípidos e da introdução de outros componentes como o colesterol na bicamada. As substâncias hidrofílicas são solubilizadas no volume aquoso interno, enquanto as substâncias lipofílicas são introduzidas no interior das bicamadas lipídicas. (10) (26)

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e número de bicamadas lipídicas, em:

- SUV (*small unilamellar vesicles*) são vesículas unilamelares pequenas constituídas por apenas uma bicamada fosfolipídica. O tamanho da partícula varia de 25 a 50 nm em diâmetro;

- LUV (*large unilamellar vesicles*) são vesículas unilamelares grandes constituídas por apenas uma camada fosfolipídica e um centro aquoso de maiores dimensões. O tamanho da partícula varia entre os 100 e os 200 µm.

- MLV (*multilamellar vesicles*) são formadas por bicamadas lipídicas concêntricas, com intervalos aquosos entre bicamadas até 10 bicamadas. A partícula tem um tamanho que varia entre 1 e 2 µm de diâmetro. (27)

No que concerne à aplicação de lipossomas no transporte de proteínas, pressupõe-se que as proteínas permaneçam incorporadas no compartimento aquoso destas NPS. No entanto, existem casos em que partes hidrofóbicas da proteína interagem com a bicamada lipídica, dando à proteína uma conformação intermédia (*"molten globule"*), em que parte da proteína está desdobrada na camada membranar. (27)

Nos lipossomas é possível a aplicação de revestimento com polímeros à superfície, como o PEG, tendo sido demonstrado que este revestimento aumenta a eficácia no

transporte de peptídeos. Foi reportado que a administração de insulina e de VIP (*vasoactive intestinal peptide*) encapsulados em lipossomas resultou numa diminuição dos níveis plasmáticos em ratos assim como na normalização da pressão arterial em hamsters hipertensos. Ao juntar polímeros (como o PEG) à superfície do lipossoma foi possível aumentar o seu tempo de circulação sanguínea através da diminuição da internalização por parte do sistema mononuclear fagocitário (28). No entanto, os lipossomas possuem baixa estabilidade, baixa eficácia de encapsulação, podem sofrer remoção rápida pelo RES, estão sujeitos a interações celulares com o lipossoma, transferências intermembranares, etc. (26)

1.4.1.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas – SLNs

As Nanopartículas Lipídicas Sólidas (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) foram apresentadas em 1990 como sistemas transportadores substitutos para os lipossomas, emulsões e para as NPPs. (26)

As SLNs possuem uma morfologia esférica, com um tamanho que varia entre os 40 e os 1000nm. A concentração de lípidos sólidos neste tipo de partículas varia entre os 0,1 e os 30% (w/w) (26). As SLNs consistem num núcleo sólido hidrofóbico com uma camada de tensoativo à superfície. Os fármacos a serem veiculados estão dispersos ou dissolvidos na matriz interna constituída por lípidos biocompatíveis e biodegradáveis (triglicéridos, glicéridos parciais, ácidos gordos de cadeia longa e ceras). Esta classe de partículas está dispersa num meio aquoso na qual é necessário a estabilização por tensoativos numa concentração que varia entre 0,5% a 5%, o que permite manter a estabilidade física das partículas. (10) A seleção dos lípidos e tensoativos na constituição da partícula afeta o tamanho da mesma, assim como a estabilidade a longo prazo durante o armazenamento, a introdução do fármaco no sistema e os perfis de libertação. (26)

Este tipo de NPs apresenta várias vantagens relativamente à produção, sendo um sistema que é de fácil preparação, com baixo custo, facilidade na transposição para produção em larga escala, bom perfil de libertação, ausência de toxicidade, e a possibilidade de produção de nanossuspensões lipídicas de maior concentração. No entanto, existem desvantagens como a imprevisibilidade de mudanças polimórficas relacionadas com os lípidos durante a produção que dificultam a administração ou o armazenamento, pois têm a tendência em expulsar o fármaco ou em gelificar o sistema coloidal. (26)

Segundo Liu et al. (29), as SLNs são uma classe de NPs com capacidade para o transporte de insulina por administração pulmonar. O estudo apresentado por estes autores incidiu sobre a aplicação de insulina em SLNs num estudo *in vivo*, usando ratinhos como modelo animal. Durante a nebulização, as SLNs transportadoras da insulina mantiveram-se estáveis, resultando numa redução dos níveis de glucose em jejum.

1.4.1.3 Transportadores Lipídicos Nanoestruturados – NLCs

Os Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (Nanostructured Lipid Carriers, NLCs), são uma nova geração de NPs lipídicas, sendo os SLNs modificados na qual a fase lipídica combina lípidos sólidos com lípidos líquidos (óleos), formando partículas sólidas estáveis à temperatura ambiente. A principal vantagem das NLCs em relação às SLNs tradicionais é a sua capacidade de encapsular uma maior quantidade de fármaco na sua matriz, devido à estrutura da mesma ser menos organizada. Este tipo de transportador apresenta maior flexibilidade, assim como menor expulsão do fármaco durante o armazenamento devido a fenómenos de recristalização e menor quantidade de água na dispersão. (26)

1.4.2 Nanopartículas Poliméricas -NPPs

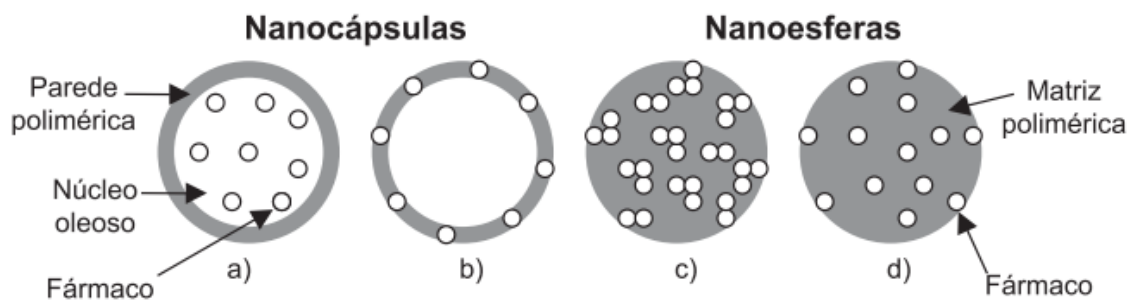


Figura 1: Nanocápsulas e nanoesferas. Adaptado de Schaffazick et al (2003). (30)

As NPPs são sistemas coloidais constituídas por polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que poderão ser naturais ou sintéticos. A utilização deste tipo de NPs para

a libertação de fármacos é vasta, sendo que foram estas NPs que influenciaram o conceito de sistemas de libertação de fármacos em locais alvo. (10)

Dependendo do método de preparação, as NPPs podem apresentar-se como nanoesferas ou nanocápsulas, que diferem entre si pela sua composição e pela sua estrutura. As nanocápsulas são sistemas reservatório constituídos por um núcleo líquido (lípidos ou aquoso) rodeado por um invólucro polimérico, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo ou encapsulado numa cavidade formada pelo polímero membranar acabando por ficar adsorvido à superfície da partícula. Nas nanoesferas, o fármaco está disperso e adsorvido uniformemente por toda a matriz da partícula, sendo libertado por difusão. (9) (30)

Têm sido efectuados estudos no que concerne à veiculação de proteínas, genes e DNA com NPPs constituídas por polímeros biodegradáveis, como: o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) ou ainda o polimetilmetacrilato (PMMA).

Os métodos de síntese das NPPs pertencem a uma de duas categorias, a polimerização *in situ* de monómeros existentes, ou a precipitação de polímeros formados previamente. (30) Na produção destes sistemas há diversos fatores a serem controlados durante o seu desenvolvimento, tais como: o tamanho da partícula, a sua carga superficial (potencial zeta) e a capacidade de libertação dos agentes farmacologicamente ativos no local de ação numa taxa e dose concordante com o regime terapêutico.

A libertação do fármaco das NPP é fortemente dependente das propriedades do polímero das quais são feitas, uma vez que tal libertação é dependente de fenómenos de difusão e dissolução do fármaco no ambiente biológico, assim como da erosão e dissolução do polímero no tecido-alvo. (31)

As NPPs são sistemas de veiculação de fármacos com inúmeras aplicações terapêuticas com a finalidade de serem administrados pela via parentérica, oral e oftálmica.

Estes NPs têm sido usados para a administração por via oral de proteínas e peptídeos, uma vez que protegem estas moléculas da degradação enzimática e hidrolítica no trato gastrointestinal. (30) As NPPs biodegradáveis também oferecem um sistema de veiculação efetivo para vacinas orais com um aumento da produção de IgA como resposta. O antigénio da vacina é encapsulado dentro da NPP ou ligado à sua superfície. (32)

As NPs mais utilizados para administração pela via pulmonar são os que incluem polímeros naturais, como a gelatina, quitosano, alginato, e polímeros sintéticos como o PLGA e o PEG. A gelatina é uma proteína biocompatível e biodegradável, que se liga de

forma covalente à substância ativa (SA) resultando numa maior eficiência. O quitosano é polissacárido com propriedades mucoadesivas que aumenta a permeação e facilita a retenção da NP no pulmão após a administração pulmonar. O alginato com a sua matriz hidrofílica biocompatível facilita a introdução da SA na partícula. O PLGA é um polímero sintético que permite uma libertação prolongada do fármaco durante um período variável, estando este período de tempo relacionado com o rácio de monómeros usados na partícula. (33)

1.4.3 Nanopartículas Virais- VNPs e VLPs

Os vírus são agentes patogénicos presentes no ambiente e no quotidiano, sendo que aqueles que infetam bactérias, mamíferos e plantas podem ser usados para o desenvolvimento de NPs à base de vírus, para tratamento humano. Os vírus são o ponto inicial ideal para o desenvolvimento de uma NP, uma vez que eles evoluíram naturalmente para distribuir ácidos nucleicos, podendo ser manipulados para distribuir outro tipo de moléculas como fármacos ou reagentes para imagem de diagnóstico. A sua replicação natural permite uma enorme escala do fabrico de VNPs à escala industrial. (34) As VNPs são compostas por proteínas e são reconhecidas pela sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de atravessar barreiras biológicas e libertar eficientemente a substância transportada nos tecidos alvos.

Nesta categoria são consideradas dois tipos de partículas: as *Vírus-based nanoparticles* (VNPs) na qual é característica a cápside modificada que contém o genoma viral, e as *vírus-like nanoparticles* (VLP) que contêm componentes proteicos, sendo esta classe não infecciosa. (35) As VNPs à base de vírus que infectam bactérias (bacteriófagos) e plantas são consideradas seguras, uma vez que estes vírus não conseguem infetar humanos. (34)

Os materiais à base de vírus possuem vários benefícios, pois são constituídos por proteínas organizadas numa estrutura multivalente que, quando combinada com o sistema imunitário, estimula a resposta imunitária humoral e celular. (35) Ao contrário das NPs sintéticas, a estrutura dos VNPs pode ser alterada não só através de reações químicas, mas também geneticamente, através da alteração da sequência de ácidos nucleicos que codificam as proteínas virais. (34) (35)

Várias estratégias foram desenvolvidas para proteger os VNPs do sistema imunitário durante o transporte até aos locais de ação específicos. A problemática com a taxa de

depuração das VNPs pode ser superada através de alterações da superfície da partícula ou do seu formato. Um exemplo é a introdução de polímeros PEG que minimizam as interações não específicas entre as partículas e os macrófagos, aumentando o tempo de circulação. VNP com um formato tubular ou filamentosos têm propriedades superiores *in vivo* às VNPs com formato esférico, nomeadamente um aumento na fluidez e marginação para a parede do vaso e a reduzida depuração por parte do sistema fagocitário mononuclear, sendo aplicadas nas terapêuticas anticancerígenas e anti-trombóticas. (34)

1.4.4 Nanopartículas Inorgânicas

Inicialmente os esforços na investigação de nanomateriais inorgânicos estavam focados no âmbito de áreas como Física e a Engenharia, mas mais recentemente tem sido estudada a sua aplicação em Biologia e Medicina. Esta classe de NPs pode ser sintetizada a partir de um vasto número de matérias-primas, como carbono, sílica, ouro, ferro e outras matérias inorgânicas, muitas das quais já possuem aplicações na área da saúde, como em sensores bioquímicos, na imagem de diagnóstico ou em aplicações terapêuticas. Estas matérias-primas formam NPs que são geralmente versáteis, com uma larga disponibilidade e funcionalidade, boa biocompatibilidade e com potencial para libertar de forma controlada e específica os fármacos ou genes transportados. (12)

As NPs inorgânicas são compostas, de forma geral, por um núcleo constituído pelo material inorgânico e um revestimento composto por polímeros orgânicos (ou metais) que proporcionam um substrato para a conjugação com biomoléculas ou protegem a região do núcleo de interações físico-químicas indesejadas com o ambiente biológico externo. (36)

1.4.4.1 Nanopartículas metálicas à base de ouro – AuNPs

As dispersões coloidais de nanopartículas de ouro (AuNPs) são uma das mais estáveis classes de NPs metálicas, com propriedades notáveis a nível das suas características óticas, magnéticas, sensoriais e bioquímicas. (12) Devido a essas mesmas propriedades, as AuNPs têm sido alvo de investigação para aplicações no âmbito de “*medical imaging*” (na deteção e diagnóstico inicial como biosensor), assim como no tratamento de doenças (incluindo terapias antitumorais) e nos sistemas de transporte de fármacos. (36)

As AuNPs são partículas compostas por um núcleo de ouro rodeado por grupos reativos com carga negativa à superfície que são facilmente otimizados, por adição de uma camada de ligandos específicos para o local de ação. Apesar de existirem inúmeros protocolos para a sua síntese, os sistemas coloidais com AuNPs para aplicação biomédica são geralmente preparados com recurso a um metal precursor, um redutor e um estabilizador. O processo consiste na redução de sais de ouro na presença de agentes redutores. Esta forma de produção permite um controlo rigoroso das propriedades óticas e elétricas da partícula que possuem uma forte dependência da sua forma e do seu tamanho (variando de 1nm até mais de 100nm). (12) (36)

A carga negativa à superfície da AuNP permite que a partícula seja facilmente (bio)funcionalizada, através de ligações iónica, covalentes ou de adsorção, por um grande espectro de macromoléculas tais como antibióticos, proteínas, moléculas de DNA e RNA. A especificidade destas NPs para os locais de ação alvo, é adquirida pela ligação destas a ligandos específicos para o local de ação. (36) A capacidade das AuNPs para se ligarem a moléculas orgânicas, o seu baixo nível de toxicidade e as suas propriedades de absorção ótica ajustável tornam estas partículas candidatas apropriadas para o transporte de fármacos (12)

1.4.4.2 Nanopartículas Magnéticas – MNP

Nanopartículas magnéticas (Magnetic Nanoparticles, MNPs) são uma classe de NPs que exhibe uma vasta variedade de atributos que a tornam numa promissora classe de transportadores de fármacos. Esta classe é de fácil manuseamento com o auxílio de um campo magnético externo, permite o uso de estratégias de libertação de fármacos de forma passiva e ativa, possibilita a visualização (através da sua utilização na técnica MRI), etc. (31)

As MNPs podem, com base nas suas propriedades magnéticas, ser divididas em metais puros (como o cobalto, manganês, níquel e ferro), ou em ligas e óxidos. No entanto, na sua aplicação em biomedicina a opção de escolha do metal é limitada, pois ainda se desconhecem os efeitos de vários metais no corpo humano. (31) Através do efeito magnético, as NPs permanecem fixas no local de ação enquanto os fármacos são libertados, fornecendo uma resposta local, e reduzindo efeitos adversos e a dosagem necessária. (37)

Para a aplicação no transporte direcionado de fármacos foram propostos dois tipos de partículas específicas, a magnetite (Fe_3O_4) e a maghemite (Fe_2O_3), às quais se dá o

nome de Nanopartículas de Óxido de Ferro Super Paramagnéticas (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPIONs). Estas partículas apresentam uma propriedade especial no que concerne ao seu tamanho, pois ao serem reduzidas para 10 a 20nm, elas demonstram um efeito de super paramagnetismo que consiste na magnetização máxima das partículas quando sujeitas ao campo magnético. No entanto, na ausência desse campo magnético as partículas não apresentam qualquer tipo de magnetismo residual. (36) Existe uma preferência para o super paramagnetismo, pois este efeito previne a aglomeração das NPs quando o campo magnético não está presente e manutenção das NPs em circulação sem sofrer remoção. (38) A modificação da superfície do SPION permite a ligação de várias proteínas, anticorpos, peptídeos e fármacos anti tumorais que se ligam especificamente aos receptores-alvo expressos nas células cancerígenas. Esta funcionalização das partículas previne a agregação das partículas, protege a superfície de oxidação e fornece uma superfície para conjugar fármacos e ligandos para o local de ação, aumentando o tempo de circulação no sangue e prevenindo o efeito do RES. (36)

Contudo, na maioria dos casos onde foram usados NTs magnéticos foram encontradas dificuldades em atingir estes objetivos, estando estas dificuldades associadas a propriedades inadequadas do sistema magnético. As MNPs têm tendência para se juntarem em agregados perdendo as propriedades específicas que advêm das suas pequenas dimensões, tornando-as difíceis de controlar. (31)

SPIONs revestidas com anticorpos tem sido alvo de avaliação para aplicação terapêutica. Um exemplo disso é o uso do anticorpo Herceptin que é um anticorpo específico para o receptor Her2/neu. Este receptor é caracterizado por ser um fator de crescimento que é expresso na superfície das células cancerígenas nos estágios iniciais do cancro da mama e é essencial para proliferação das mesmas. (39) A interação do anticorpo Herceptin com o receptor resulta na inativação do mesmo e inibição da proliferação celular. (39) (40)

1.4.4.3 Nanopartículas de Sílica Mesoporosa – MSN

Materiais mesoporosos, classificado pela IUPAC como matérias com poros de diâmetro entre os 2 e os 50nm, são materiais com aplicação biomédica que têm vindo a ser desenvolvidos desde a sua descoberta em 1990. (12) Devido aos seus poros com limites bem definidos, extensos volumes internos, grande área superficial e canais estreitos que permitem a adsorção de moléculas, os materiais mesoporosos tornaram-

se interessantes para a veiculação de moléculas, nomeadamente proteínas e fármacos, e para a libertação prolongada dos mesmos. (37) Os poros possuem mecanismos que abrem e fecham o canal sendo controlados por vários sistemas, como pela presença de polímeros, nanocristais, ou de interações externas como o calor, pH, luz ou químicas. (41)

De entre os vários materiais desta classe (como a sílica, titania, zirconia, alumina), a sílica mesoporosa suscitou um interesse especial no que concerne à veiculação de fármacos. Esta matéria apresenta boa estabilidade física e química, uma capacidade de carga superior à dos lipossomas e dos sistemas poliméricos e um bom perfil para veiculação controlada de fármacos. (42)

A sílica mesoporosa é relatada como um material relativamente “não-tóxico” e biocompatível, dependendo da dosagem e da via de administração. (42) Este tipo de partículas possui inúmeras pesquisas na área da regeneração de tecido ósseo. Temos, como exemplo, o uso de MSNs transportadoras de BMP2 (um fator de crescimento que induz a diferenciação dos osteoblastos e a promoção da regeneração óssea) usadas para avaliar a eficiência na diferenciação osteogénica através da avaliação da endocitose e internalização de MSNs funcionais. O resultado na formação de ossos ectópicos foi estudado *in vivo*, demonstrando a utilidade das MSNs transportadoras de BMP2 na reparação de tecido ósseo. (43) (44)

1.4.4.4 Hidroxiapatite

Os fosfatos de cálcio, são um dos principais componentes do osso natural, tendo propriedades biocompatíveis e bioativas que permitem a sua utilização para a reconstrução óssea. (42)

Um exemplo é a hidroxiapatite, um material não imunogénico, biocompatível e biodegradável. Os produtos da sua degradação (iões cálcio e fosfato) não apresentam toxicidade. A sua interação com as células intervenientes na osteogénese, torna este material interessante para a sua aplicação biomédica na regeneração óssea. Neste contexto, a sua aplicação no transporte de fatores de crescimento é bastante promissora, uma vez que o seu transporte não provoca alterações da conformação da cadeia, nem cisões ou até mesmo degradação proteica até ao local de ação. (42)

1.5 Toxicidade

A toxicidade das NPs é definida como a capacidade de estas causarem efeitos adversos na fisiologia normal, ou afetar diretamente a estrutura normal, do órgão ou do tecido em causa. (14) As propriedades físico-químicas das NPs (como o tamanho da partícula, formato, carga superficial e composição química) influenciam a sua interação com as células e a sua estabilidade, e consequentemente, a sua potencial toxicidade. (14) (45) Dependendo do seu tamanho e constituição, algumas NPs podem produzir danos irreversíveis em células devido ao *stress* oxidativo ou a danos causado nos organelos celulares. (46) Partículas constituídas pelo mesmo nanomaterial podem ter comportamentos diferentes nas mesmas condições biológicas, dependendo das suas propriedades físico-químicas específicas. (14)

Estes fatores são controlados durante a produção da partícula e podem afetar a interação dos nanomateriais com as células dos tecidos, sendo que NPs com maior permeabilidade celular proporcionam uma maior efetividade no transporte de fármacos, mas também poderão causar potenciais ameaças à saúde do utente. (14)

O tamanho da partícula contribuí para a citotoxicidade. Em partículas que possuam a mesma massa, partículas de menor volume possuem uma área superficial específica (Specific Superficial Area, SSA) maior do que as partículas de maiores dimensões, uma vez que o razão entre a área superficial e o volume aumenta com a redução do tamanho da partícula, tornando a superfície da partícula numa área mais disponível para interagir com os componentes da célula como as proteínas, ácidos nucleicos, ácidos gordos e glícidos. (45)

Segundo Kim et al (43), num estudo envolvendo NPs de prata (AgNPs) com tamanhos diferentes (10, 50 e 100nm), confirmou-se a dependência da toxicidade celular com o tamanho das partículas. Neste artigo, foi avaliado o nível de toxicidade de AgNPs através dos níveis de libertação de LDH, dos níveis de regeneração de espécies reativas de oxigénio (ROS) e pela avaliação da viabilidade celular. Os resultados mostraram que a toxicidade era dependente da dose e do tamanho da partícula, com as AgNPs de menor tamanho (10nm) tendo um maior efeito apoptótico sobre as células em estudo, do que as partículas de tamanho superior. Sugeriu-se que a diferença nos resultados estava associada ao processo de internalização nas membranas celulares e nos poros nucleares. (47) Outro estudo envolvendo partículas de dióxido de titânio (TiO₂), reportado por Jiang et al. (48) demonstrou a existência de uma correlação entre o tamanho da anatase de TiO₂ e a produção de ROS, quando se comparou esta produção por área de superfície com um determinado tamanho. Partículas entre os 10nm e os 30nm apresentaram um aumento na produção de ROS por unidade de superfície, enquanto as partículas abaixo de 10nm e

acima de 30nm produziram níveis similares de ROS. Isto revela que existe uma relação complexa entre a toxicidade e as propriedades das NPs. (45) (48)

O formato da partícula também tem efeitos nos níveis de toxicidade, tal como também descrito no estudo de Jiang et al. (48) com NPs de TiO_2 . Neste estudo observou-se que as NPs de dióxido de titânio no estado amorfo geravam mais ROS do que as outras formas minerais de tamanho semelhante (anatase e rutilo). Sugeriu-se que esta maior produção de ROS pela forma amorfa do TiO_2 está relacionada com o facto da partícula possuir mais defeitos à superfície e por isso mais locais com a capacidade de gerar ROS. (48) Foi também relatado que partículas de Fe_2O_3 em “*rod-shape*” produziram mais respostas de citotoxicidade em linhas celulares de macrófagos de ratinho do que as NPs com a mesma composição em formato esférico, sendo estas respostas traduzidas em produção de ROS, resposta inflamatória, níveis aumentados de lactato desidrogenase (LDH) e indução de necrose. (45) (49)

A carga superficial da partícula tem influência na internalização celular da mesma e no modo como a partícula interage com os organelos e as biomoléculas, desta forma influenciando a citotoxicidade. Segundo Kai et al. (50), a toxicidade das NPs aumenta com o aumento da sua carga superficial, sendo tal comprovado no seu estudo envolvendo partículas de Fe_3O_4 revestidas com ácido oleico, carbono e sem revestimento com cargas com valores de 4.5 mV, 23.7mV e 14.5 mV, respetivamente. O estudo sugeriu que quanto maior for a carga positiva da NP, maiores serão as interações electrostáticas com a célula, aumentando assim a internalização celular em células do hepatoma humano (BEL-7402) e a sua apoptose por indução de ROS. (45) (50) As NPs tendem a ser internalizadas quanto maiores forem as interações electrostáticas, sendo este fenómeno explicado pela composição da membrana celular. Os glicosaminoglicanos (GAG) são constituintes existentes em grande quantidade na membrana celular dos mamíferos que possui uma carga negativa que capaz de atrair as partículas carregadas positivamente, de forma a ser internalizadas. A mesma interação é recorrente com o DNA, sendo este carregado negativamente e danificado pelo processo de interação com a partícula. (45) (51)

2. Aplicação de nanopartículas em terapias à base de proteínas

Com o desenvolvimento da nanotecnologia e da nanomedicina, deu-se um aumento do número de produtos farmacêuticos à escala nanométrica aprovados e comercializados. Estes produtos podem ser classificados como agentes terapêuticos ou veículos de transporte da SA para partes específicas do corpo. (52) Um estudo à escala global conduzido pela *European Science and Tehnology Observatory* em 2006 demonstrou que mais de 150 empresas estavam a desenvolver terapêuticas à escala nanométrica. (53) O sucesso de formulações de NPs como o Doxil® (1995), DaunoXome® (1996), Abraxane® (2005) entre outros, prepararam o caminho para exploração e desenvolvimento de tecnologias para o transporte de proteínas em NPs.

2.1 Anticorpos

Cimzia®: é um bloqueador do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) com o nome de certolizumab pegol (CZP) que recebeu aprovação da FDA em 2008 e da EMA em 2009. Cimzia é um fragmento Fab (parte de um anticorpo IgG humanizado que não possui a região Fc) que foi revestido por PEG e que reconhece e se liga especificamente ao TNF-alfa, neutralizando a sua atividade pró-inflamatória. É usado no tratamento de pacientes com doenças autoimunes, nas quais existe uma resposta imunológica do paciente contra os seus próprios tecidos saudáveis, como na artrite reumatoide, doença de Crohn, artrite psoriática e espondilite anquilosante. (52) (54)

2.2 Citoquinas

Pegasys®: tem o nome genérico de peginterferon alfa-2a e foi aprovado pela FDA e pela EMA em 2002. (55) O interferão alfa-2a é um interferão recombinado humano que é conjugado com um revestimento de PEG e usado no tratamento da hepatite C de forma isolada ou conjugada com a ribavirina.(52) O revestimento com PEG permite que a periodicidade de administração de Pegasys ocorra apenas uma vez por semana, por injeção subcutânea, em comparação com a necessidade de administrar três vezes por semana o interferão na forma livre. (56)

Adynovi®: é um factor anti-hemofílico recombinado revestido com PEG, com o nome genérico de **Rurioctocog alfa**, usado no tratamento da hemofilia A em pacientes com

eventos hemorrágicos frequentes, aprovado pela EMA em 2018. (57) O Adynovi aumenta os níveis de fator de coagulação VIII no sangue durante um período limitado da mesma forma que o fator de coagulação normal do sangue. (52)

Refixia®: é uma glicoproteína com o nome genérico de nonacog beta pegol e foi aprovada pela EMA em 2017. É um fator de coagulação IX recombinado e revestido por PEG, administrado por via intravenosa no tratamento e profilaxia de hemorragias em pacientes como hemofilia B, com idade superior a 12 anos. (58) (59)

2.3 Enzimas

Adagen®: é uma NP na qual a adenosina deaminase (ADA) é revestida com PEG, sendo a primeira fórmula de uma proteína terapêutica em NPs no mercado, com aprovação da FDA em 1990. A ausência de ADA promove a acumulação de adenosina que resulta em problemas metabólicos relacionados com a função dos linfócitos. Esta condição é rara, tornando este fármaco num fármaco para doenças órfãs. Antes do Adagen, esta imunodeficiência era tratada com transplantes de medula óssea, uma vez que a ADA normal apresentava baixa circulação *in vivo* e despoletava respostas por parte do sistema imunitário. (52) (56) Isto foi solucionado com o revestimento com PEG, de acordo com Davis et al. (60), num artigo que mostra que a ADA revestida com PEG possui maior tempo de circulação e induz uma menor resposta imunogénica.

2.4 Fatores de crescimento

Neulasta® é um medicamento aprovado pela FDA e pela EMA em 2002 (61). Em doentes com cancro não-mielóide, é comum ocorrer neutropenia como efeito adverso do tratamento com quimioterapia.(52) Neulasta é uma forma revestida por PEG de filgrastim, um fator de crescimento dos leucócitos usado na neutropenia febril, sendo esta uma molécula recombinada da G-CSF produzida em *E.coli*. O revestimento de PEG permite aumentar o tempo de circulação da molécula de 3,5 a 3,8h (proteína isolada) para um período de 42h (NPs). (56)

Mircera®: é um medicamento aprovado pela FDA e pela Ema em 2007, para o tratamento da anemia.(62) A Mircera é uma forma de eritropoietina recombinada geneticamente, conjugada com metoxi-PEG, que é capaz de estimular a eritropoiese nos receptores das células progenitoras da medula óssea. Esta formulação proporciona uma

libertação controlada com uma semivida de 135 h, em comparação com a eritropoietina isolada com uma semivida de 7-20h. (52)

3. Prospetivas para o futuro

A ciência da nanomedicina constitui uma das mais fascinantes áreas de investigação actuais. A pesquisa nesta área nas últimas duas décadas já levou à criação de 1500 patentes e à realização de dezenas de ensaios clínicos. (53) O uso de marcadores biológicos para os tecidos alvo que permitem o foco absoluto, sem afetar os tecidos normais é uma das maiores áreas de pesquisa na aplicação da nanomedicina e do sistema de veiculação de fármacos. (53)

A via pulmonar é umas das vias não-invasivas mais investigadas no desenvolvimento da absorção de proteínas e péptidos terapêuticos. Esta via possui diversas vantagens, como a enorme área de absorção, alta vascularidade, membrana epitelial fina e uma baixa atividade enzimática. Por exemplo, NPs transportadoras de Alfa1-antitripsina (α 1AT) revestidas com PLGA foram identificadas como uma formulação promissora para o tratamento de doenças respiratórias. (63) A α 1AT é uma proteína inibidora da serino-protease que protege o tecido pulmonar de enzimas inflamatórias, como a elastase. A elastase é uma enzima que promove a degradação da elastina com consequente perda de elasticidade nos tecidos pulmonares. Esta degradação do tecido pulmonar resulta em complicações como enfisema ou DPOC em adultos. Pirooznia et al. (64) reportaram que a libertação *in vitro* da formulação de alfa1-antitripsina era dependente do tipo de PLGA usado na NP: PLGA na proporção de 50:50 (ácido láctico/ácido glicólico) demonstrava uma libertação de 60% do fármaco em oito horas com uma libertação imediata de 30%, enquanto uma proporção de 75:25 tinha um perfil de libertação contínuo e mais prolongado. Nochi et al (65) desenvolveram um sistema de veiculação de uma vacina de forma intranasal num hidrogel à escala nanométrica. As ligações cross-linked do nanogel encapsularam a proteína a ser administrada na matriz polimérica através de ligações hidrofóbicas, promovendo a libertação do antigénio na membrana epitelial da célula. Neste estudo foi usado um receptor não tóxico de uma neurotoxina da *C. botulinum* (BoHc/A) como subunidade antigénica protótipo, que através da tomografia de emissão de positrões e estudos histoquímicos revelou que o nanogel penetrou na mucosa nasal e libertou gradualmente BoHc/A nas células epiteliais. O sucesso na imunização com BoHc/A foi confirmado com um marcado aumento de IgA nas células da lamina própria.

A via oral é uma via de administração privilegiada, pois a administração de NP em suspensões ou em formas sólidas por esta via é feita de forma não invasiva através da digestão, sendo este um fator que aumenta a adesão do paciente. (66) Uma das proteínas com mais estudos desenvolvidos para administração oral é a insulina. Num desses estudos (Pridgen et al, 67) observou-se que o receptor neonatal Fc (FcRN), que é

expresso na região apical das células epiteliais do intestino delgado que tem a função de mediar o transporte da IgG, pode ser aplicado na administração oral de NPs através da internalização pelo epitélio intestinal dos roedores. Com o uso de NPs sintetizadas à base de PLA-PEG-maleimide e que foram conjugadas covalentemente à superfície com fragmentos FC da IgG policlonal (Fc-NPs), a insulina foi encapsulada por nanoprecipitação. Os receptores FcRn na superfície apical das células epiteliais capturavam as Fc-NPs e internalizavam a partícula pelo processo de transcitose, evitando a degradação por lisossomas. Os resultados destes ensaios *in vivo*, relativamente à administração de FcNPs em ratinhos revelou que as Fc-NPs transportadores de insulina promoviam uma resposta hipoglicémica prolongada comparativamente com a insulina livre em circulação, enquanto NPs sem qualquer tipo de ligando Fc não produziam qualquer tipo de efeito nos níveis de glicose. (66)

A via transdérmica também oferece uma alternativa menos dolorosa que a via parentérica, mas com aplicação para fármacos mais pequenos e hidrofóbicos, uma vez que estes são mais facilmente absorvidos pela pele, devido à maior permeabilidade do estrato córneo. (68) Nose et al (69) reportaram a eficácia no uso de *gold nanorods* (GNRs) com irradiação por luz infravermelha para a diminuição nos níveis de glucose no ratinho diabético. Neste ensaio, GNRs carregadas com insulina foram emulsionadas com o auxílio de tensoativos (L-195 e isopropil miristato) e demonstraram possuir uma maior penetração com a aplicação de radiação infravermelha do que as outras formulações sem a radiação ou sem os tensoativos. Estes resultados sugerem que a absorção da radiação infravermelha promove a penetração da insulina ao converter a radiação em calor nas GNR que causam uma disrupção nos lípidos das células da pele. Este tratamento resultou numa redução de 58% nos níveis de glucose sanguínea em ratinho diabético em 4 horas. (69)

Conclusão

O recente desenvolvimento da bioengenharia e da recombinação genética tornou possível introdução das proteínas como agentes terapêuticos de excelência para o tratamento de patologias crônicas do ser humano. Embora esta classe tenha inúmeras vantagens comprovadas, tais como a elevada eficácia e alta seletividade no tratamento das patologias, também apresenta problemas na sua aplicação, relacionados com a sua instabilidade e baixa biodisponibilidade. Desta forma, a manutenção da estabilidade das proteínas terapêuticas é uma das prioridades para a sua aplicação e assim sendo os sistemas que permitem manter a estabilidade das proteínas terapêuticas são fatores tão importantes quanto as proteínas, podendo ser determinantes para a eficácia da terapêutica.

Com a introdução da nanotecnologia na medicina, e com a criação de sistemas de veiculação de fármacos, deu-se um grande passo no desenvolvimento de terapias à base de proteínas. Estes sistemas, que incluem as NPs, possuem um elevado potencial na absorção proteínas nas células via diferentes vias de administração. A aplicação de ligandos seletivos na superfície das NPs, como os anticorpos, e a aplicação de revestimentos com polímeros são duas das inovações que conferem uma maior seletividade e proteção nesta nova tecnologia.

Desta forma, o futuro do tratamento de patologias não está apenas relacionado com a descoberta de novas moléculas com alto perfil terapêutico, mas também com o desenvolvimento de novas tecnologias que garantam a eficácia de moléculas já existentes.

Referências bibliográficas

1. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(1):21–39.
2. Y Yun, Y Woo Cho KP. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;23(1):1–7.
3. Grenha A. The era of nanomedicine. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(2):181.
4. Lien S, Lowman HB. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 2003;21(12):556–62.
5. Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. Vol. 66, *Biopolymers - Peptide Science.* 2002;66. 184–99.
6. Ratnaparkhi MP, Chaudhari SP, Pandya V. Peptides and proteins in pharmaceuticals. *Int J Curr Pharm Res.* 2011;3(2):1–9.
7. Basha SK, Dhandayuthabani R, Muzammil MS, Kumari VS. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery. *Mater Today Proc.* 2020;
8. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):478–90.
9. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A review. *Trop J Pharm Res.* 2007;5(1):561–73.
10. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(9):1790–8.
11. Ciucă AG, Grecu CI, Rotărescu P, Gheorghe I, Bolocan A, Grumezescu AM, et al. Nanostructures for drug delivery: pharmacokinetic and toxicological aspects. Elsevier; 2017. p. 941–57.
12. Santos HA, Bimbo LM, Peltonen L, Hirvonen J. Inorganic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery and Imaging. 2015. 571–613 p.
13. Zhao Z, Ukidve A, Krishnan V, Mitragotri S. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;143:3–21.
14. Li X, Wang L, Fan Y, Feng Q, Cui FZ. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes. *J Nanomater.* 2012;2012(4):1–19.
15. Jain A, Singh SK, Arya SK, Kundu SC, Kapoor S. Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications. *ACS Biomater Sci Eng.* 2018;4(12):3939–61.
16. Feng X, Chen Y. Drug delivery targets and systems for targeted treatment of rheumatoid arthritis. *J Drug Target.* 2018;26(10):845–57.

17. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):161–71.
18. Decuzzi P, Lee S, Bhushan B, Ferrari M. A theoretical model for the margination of particles within blood vessels. *Ann Biomed Eng*. 2005;33(2):179–90.
19. Ngoune R, Peters A, von Elverfeldt D, Winkler K, Pütz G. Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *J Control Release*. 2016;238:58–70.
20. R Mout, DF. Moyano, S Rana and VMR. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
21. Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Müller RH. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: Analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002;54(2):165–70.
22. Duan X, Li Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*. 2013;9(9-10):1521-1532.
23. Jokerst J V., Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*. 2011;6(4):715-728.
24. Solaro R, Chiellini F, Battisti A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. *Materials*. 2010;3(3):1928–80.
25. Martins S, Sarmento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - Liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):595–607.
26. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2015;5(3): 305-313.
27. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Lipid carriers: A versatile delivery vehicle for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi*. 2008;128(2):269–80.
28. Du AW, Stenzel MH. Drug carriers for the delivery of therapeutic peptides. *Biomacromolecules*. 2014;15(4):1097–114.
29. Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, Chen Q, et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm*. 2008;356(1–2):333–44.
30. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas L de L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*. 2003;26(5):726–37.

31. Zamani H, Bazgir L, Roomi A. Nanoparticles as drug delivery. *IIOAB J.* 2016;7:342–6.
32. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2013;3:1-13
33. Menon Ju, Ravikumar P, Pise A, Gyawali D, CC N, Cc H. Polymeric Nanoparticles for Pulmonary Protein and DNA Delivery. *Acta Biomater.* 2015;10(6):2643–52.
34. Koudelka KJ, Pitek AS, Manchester M, Steinmetz NF. Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annu Rev Virol.* 2015;2(1):379–401.
35. Lee KL, Steinmetz N. Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2017;8(4):554-578.
36. Lombardo D, Kiselev MA, Caccamo MT. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *J Nanomater.* 2019.
37. Akbarzadeh A, Samiel M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters.* 2012;7(144):2550-55.
38. Denkbaşı EB, Çelik E, Erdal E, Kavaz D, Akbal Ö, Kara G, et al. Magnetically based nanocarriers in drug delivery. *Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials.* 2016. 285–331 p.
39. Omid Veisheh, Jonathan Gunn MZ. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;62(3):284–304.
40. Sakamoto JH, Smith BR, Xie B, Rokhlin SI, Lee SC, Ferrari M. The molecular analysis of breast cancer utilizing targeted nanoparticle based ultrasound contrast agents. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4(6):627–36.
41. Natarajan SK, Selvaraj S. Mesoporous silica nanoparticles: Importance of surface modifications and its role in drug delivery. *RSC Adv.* 2014;4(28):14328–34.
42. Malmsten M. Inorganic nanomaterials as delivery systems for proteins, peptides, DNA, and siRNA. *Elsevier.* 2013;18(5):468–80.
43. Narayan R, Nayak UY, Raichur AM, Garg S. Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. *Pharmaceutics.* 2018;10(3):1–49.
44. Zhou X, Feng W, Qiu K, Chen L, Wang W, Nie W, et al. BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater*

- Interfaces. 2015;7(29):15777–89.
45. Huang YW, Cambre M, Lee HJ. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):1-13.
 46. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):17–71.
 47. Kim TH, Kim M, Park HS, Shin US, Gong MS, Kim HW. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2012;100 A(4):1033–43.
 48. Jiang J, Oberdörster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology.* 2008;2(1):33–42.
 49. Lee JH, Ju JE, Kim B II, Pak PJ, Choi EK, Lee HS, et al. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(12):2759–66.
 50. Kai W, Xiaojun X, Ximing P, Zhenqing H, Qiqing Z. Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res Lett.* 2011;6(480):1–10.
 51. Huang YW, Lee HJ, Tolliver LM, Aronstam RS. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: Opportunities and challenges. *Biomed Res Int.* 2015;2015:11–3.
 52. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. Vol. 14, *Nanomedicine.* 2019. 93–126 p.
 53. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):1–33.
 54. Connock M, Tubeuf S, Malottki K, Uthman A, Round J, Bayliss S, et al. Certolizumab pegol (CIMZIA®) for the treatment of rheumatoid arthritis. Health technology assessment (Winchester, England). 2010.
 55. Pegasys | European Medicines Agency [Internet]. [citado 26 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pegasys>
 56. Alconcel SNS, Baas AS, Maynard HD. FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. *Polym Chem.* 2011;2(7):1442–8.
 57. Adynovi | European Medicines Agency [Internet]. [citado 26 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adynovi>

58. Refixia | European Medicines Agency [Internet]. [citado 27 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/refixia>
59. Syed YY. Nonacog Beta Pegol: A Review in Haemophilia B. *Drugs*. 2017;77(18):2003–12.
60. Davis S, Abuchowski A, Park YK, Davis FF. Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol. *Clin Exp Immunol*. 1981;46:649-52;
61. Neulasta | European Medicines Agency [Internet]. [citado 26 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/neulasta>
62. Mircera | European Medicines Agency [Internet]. [citado 26 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mircera>
63. Patel A, Patel M, Yang X, Mitra A. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *Protein Pept Lett*. 2014;21(11):1102–20.
64. Pirooznia N, Hasannia S, Lotfi AS, Ghanei M. Encapsulation of Alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: In Vitro characterization as an effective aerosol formulation in pulmonary diseases. *J Nanobiotechnology*. 2012;10:1–15.
65. Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada SI, Mejima M, Kohda T, et al. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater*. 2010;9(7):572–8.
66. Yu M, Wu J, Shi J, Farokhzad OC. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *J Control Release*. 2016;240:24–37.
67. Pridgen, E. M., F. Alexis, T. T. Kuo, E. Levy-Nissenbaum, R. Karnik, R. S. Blumberg, R. Langer and OCF. Transepithelial Transport of Fc-targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Sci transl Med*. 2013;23(1):1–7.
68. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1261–8.
69. Nose K, Pissuwan D, Goto M, Katayama Y, Niidome T. Gold nanorods in an oil-base formulation for transdermal treatment of type 1 diabetes in mice. *Nanoscale*. 2012;4(12):3776–80.