



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

APLICAÇÕES MÉDICAS DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Trabalho submetido por
Ana Vanessa Rodrigues Serrano
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**APLICAÇÕES MÉDICAS DAS NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS**

Trabalho submetido por
Ana Vanessa Rodrigues Serrano
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Ana Isabel Henriques Dias Fernandes Pinto

novembro de 2017

*Ao Paulo,
Por tudo aquilo que me tem proporcionado.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar um agradecimento a todos aqueles que contribuíram para que esta grande etapa da minha vida se tornasse em algo único e inesquecível:

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela confiança e por nunca me deixarem desanimar. Não consigo pôr em palavras a minha gratidão para convosco. Obrigada por tudo o que me proporcionam. Espero nunca vos desiludir.

Ao Orlando, por todo o amor, amizade, apoio e, principalmente, por toda a paciência ao longo destes anos. Foste um dos meus pilares. Obrigada pela pessoa que és e por me amparares, sempre.

À minha estrelinha da sorte, por me ter guiado todo este tempo. Sei que mesmo longe, tens olhado por mim.

À minha família e amigos, pelas palavras sempre reconfortantes, apoio e motivação.

Ao Miguel, por toda a preocupação e pelos conselhos dados ao longo desta caminhada. Recordarei sempre com carinho tudo o que tens feito por mim.

Ao David Nunes, pela amizade de sempre e por estar presente em todas as etapas deste percurso.

À minha grande amiga Joana Videira, por todos os excelentes momentos passados. Guardarei para sempre todas as nossas histórias, aventuras e brincadeiras. Fizeste com que estes anos passassem a voar.

Aos meus amigos Maria Galamba, Susana Ferreira, Ana Isabel Teixeira e Miguel Silvestre por todos os dias fazerem deste percurso algo que jamais esquecerei. Espero que o nosso caminho seja sempre feito lado a lado.

Por último, mas não menos importante, o meu sincero agradecimento à professora Ana Isabel Fernandes, pelo apoio e disponibilidade ao longo deste trabalho. Obrigada pelos seus conselhos e palavras encorajadoras.

RESUMO

As Nanopartículas Poliméricas são estruturas bastante promissoras, caracterizadas por dimensões reduzidas e às quais está associada uma elevada eficácia, segurança e biocompatibilidade. Por serem igualmente versáteis, o seu potencial para aplicações em diversas áreas médicas, como forma de ultrapassar as atuais limitações inerentes às mesmas, é bastante investigado.

Nesta revisão da literatura analisar-se-á a utilização das nanopartículas poliméricas na área do diagnóstico, em particular quando aplicadas em técnicas imagiológicas bastante comuns como a tomografia axial computadorizada e a ressonância magnética. Serão igualmente explorados os benefícios da sua aplicação na área dos pró-fármacos, na área dos *nanothranostics* – nanopartículas poliméricas que atuam, simultaneamente, a nível do diagnóstico e da terapêutica – e também na área da engenharia de tecidos.

Adicionalmente, será também discutida a sua utilização ao nível da terapêutica, nomeadamente como sistemas de veiculação de fármacos, devido ao grande progresso que se tem verificado nesta área durante os últimos anos. No âmbito desta aplicação analisar-se-ão os resultados obtidos com a utilização destas estruturas na veiculação de fármacos anticancerígenos, anti-infecciosos e daqueles cuja ação recai sobre o sistema nervoso central.

O modo de ação das nanopartículas poliméricas em cada área, as vantagens da sua utilização, e os progressos até agora obtidos com as mesmas serão explorados, tendo como suporte estudos *in vitro* e *in vivo* realizados no âmbito das suas aplicações médicas.

Palavras-chave: Nanopartículas Poliméricas | Medicina | Terapêutica | Diagnóstico

ABSTRACT

Polymeric Nanoparticles are very promising structures, characterized by small dimensions and to which high efficiency, safety and biocompatibility are associated. In addition, due to their versatility, the application potential in several medical areas, as a way of overcoming their own inherent existing limitations, has been extensively researched.

In this literature review, the use of polymeric nanoparticles in the diagnostic area will be analyzed, mainly as applied in ordinary imaging techniques such as computed tomography and magnetic resonance imaging. The benefits of its application in the field of prodrugs, in the area of nanotheranostics – polymeric nanoparticles, which simultaneously act at the diagnosis and therapy level – and also in the field of the tissue engineering, will also be explored.

Additionally, its use in therapeutics, namely as drug delivery systems, will also be discussed, due to the great progress that has been made in this area in recent years. Under this application, the results achieved with the use of such structures will be analyzed, in the delivery of anticancer and anti-infective drugs and those acting on the central nervous system.

The mode of action of the polymeric nanoparticles in each area, the advantages of their use, and the progress so far obtained will be exploited, sustained by *in vitro* and *in vivo* studies carried out within the scope of their medical applications.

Keywords: Polymeric Nanoparticles | Medicine | Therapy | Diagnosis

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	9
2. ÁREAS DE APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM MEDICINA	15
2.1. Diagnóstico/Imagiologia	15
2.1.1. Tomografia axial computadorizada.....	17
2.1.2. Ressonância Magnética	21
2.2. Pró-Fármacos	25
2.3. <i>Nanotheranostics</i>	29
2.4. Engenharia de Tecidos	31
3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS	37
3.1. Anticancerígenos	38
3.2. Doenças Neurodegenerativas	44
3.3. Anti-infecciosos	49
4. CONCLUSÃO	55
5. BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das várias técnicas de preparação das NPP	10
Figura 2: Diferenças entre nanoesfera e nanocápsula	11
Figura 3: Vias de formação de NPP através de conjugação covalente (Tipo I) ou encapsulação física (Tipo II) de agentes de contraste à matriz polimérica, para aplicações imagiológicas.....	17
Figura 4: Representação esquemática da formação das NPP de poli(io-hexol).....	18
Figura 5: Imagens dos tecidos tumorais, obtidas através da TAC, anterior e posteriormente à administração de io-hexol e NPP de poli(io-hexol).....	19
Figura 6: Representação esquemática das nanoemulsões estabilizadas como agentes de contraste da TAC	20
Figura 7: Resultados do sinal da RM em diferentes tecidos <i>in vivo</i>	24
Figura 8: Representação esquemática do funcionamento de um pró-fármaco.....	25
Figura 9: Estrutura química do composto hidrofóbico de Pt(IV) e reação química de redução através da qual é obtido o fármaco ativo, cisplatina	27
Figura 10: Representação esquemática das NPP de Pt(IV) direcionadas	27
Figura 11: Cinética de libertação <i>in vitro</i> do pró-fármaco encapsulado a partir das NPP	28
Figura 12: Toxicidade hepatocitária entre o grupo controlo, PolyGd e Gd ³⁺ livre após exposição aos compostos.....	31
Figura 13: Estratégia utilizada na engenharia de tecidos	32
Figura 14: Representação esquemática da formação das NPP em estudo para a libertação controlada de fatores de crescimento e subsequente combinação com scaffolds de colagénio.....	34

Figura 15: Representação esquemática da estrutura de um sistema de veiculação de fármacos baseado em NPP	39
Figura 16: Representação do efeito EPR.....	40
Figura 17: Perfil de libertação da cisplatina a partir das NPP.....	41
Figura 18: Inibição do crescimento das células IGROV1-CP quando expostas à cisplatina livre e às NPP	42
Figura 19: Perfil de libertação <i>in vitro</i> de 5-FU a partir de NP de PLGA 50-50 e 90-10	43
Figura 20: Principais vias de passagem das NP através da BHE.....	46
Figura 21: Perfis de libertação <i>in vitro</i> relativos a DA/NPCS (5) e DA/NPCS (1)	48
Figura 22: Libertação <i>in vitro</i> de rifampicina e azitromicina a partir de NPP encapsuladas com cada um dos antibióticos em separado e NPP encapsuladas com os dois antibióticos em simultâneo.....	50
Figura 23: Comparação entre os níveis do tratamento antirretroviral nos compartimentos subcelulares de células H9 em cultura com NPP contendo a associação de fármacos ou com os fármacos isolados depois de 7 dias de incubação com HIV-1 _{NL4-3}	53

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU - 5-fluorouracilo;

AG -Ácido Gordo;

APMA - Ácido polimetacrílico;

aFGF - Fator de crescimento fibroblástico ácido;

Apt - Aptâmero;

CHC - Carcinoma hepatocelular;

CS - Quitosano;

BHE - Barreira hematoencefálica;

BSA - Albumina de soro bovina;

DA - Dopamina;

DIH - Diisocianato de hexametileno;

DL₅₀ - Dose letal média;

Dox - Doxorrubicina;

DTPA – Ácido dietilenotriaminapentaacético;

EFV - Efavirenz;

EPR - *Enhanced permeability and retention*;

ET - Engenharia de tecidos;

Gd - Gadolínio;

IC₅₀ - Concentração inibitória mínima;

I.V. - Intravenoso;

LPV/r - Lopinavir potenciado com ritonavir;

MEC - Matriz extracelular;

NP - Nanopartículas;

NPP - Nanopartículas Poliméricas;

PA - Pancreatite aguda;

PEG - Polietilenoglicol;

PGA - Ácido poliglicólico;

PLA - Ácido polilático;

PLGA - Ácido polilático-co-glicólico;

PSMA - Antígeno membranar específico da próstata;

Pt - Platina;

RF - Radiofrequência;

RM - Ressonância magnética;

siRNA - *Short interfering RNA*;

SNC - Sistema nervoso central;

TAC - Tomografia axial computadorizada;

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial;

UH - Unidades de hounsfield.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas poliméricas (NPP) são estruturas biocompatíveis e biodegradáveis cujo tamanho pode variar entre 10-1000 nm e constituem, na área da medicina, uma estratégia cada vez mais investigada e de grande importância (Banik, Fattahi, & Brown, 2016; Nagavarma, Yadav, Ayaz, Vasudha, & Shivakumar, 2012; Parveen, Misra, & Sahoo, 2012). Antes de serem exploradas as suas aplicações é fundamental perceber um pouco mais sobre estas estruturas que tendem a revolucionar a medicina moderna (Banik et al., 2016).

As NPP são, tal como o nome indica, constituídas por polímeros. Os polímeros, por sua vez, podem classificar-se em naturais ou sintéticos e devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, cumprindo ainda outros requisitos. Deste modo, não devem originar reações inflamatórias; devem ter um tempo de degradação sincrónico com o objetivo pretendido; possuir propriedades mecânicas, permeabilidade e processabilidade adequadas à aplicação idealizada e originar produtos de degradação não tóxicos, de fácil excreção. O quitosano (CS), a gelatina, o alginato e a albumina são os polímeros naturais mais habitualmente utilizados na produção das NPP. Já os polímeros sintéticos têm como exemplos comuns o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático-co-glicólico (PLGA), policaprolactona, polianidridos, polietilenoglicol (PEG) e ácido polimetacrílico (APMA), entre outros (Nagavarma et al., 2012; Ulery, Nair, & Laurencin, 2011).

Inicialmente, as NPP utilizadas eram constituídas por polímeros não biodegradáveis contudo, verificou-se toxicidade crónica e respostas inflamatórias com a sua utilização, o que provocou uma mudança estratégica para polímeros biodegradáveis. Estes últimos começaram a ocupar um lugar de destaque na formulação das NPP devido à sua reduzida toxicidade, aos seus adequados perfis de libertação e à favorável biocompatibilidade que os caracteriza (Banik et al., 2016).

Um polímero com composição e estrutura bem definida facilita a obtenção de NPP com comportamentos controlados, fator crucial para que as mesmas alcancem as funções pretendidas (Nasir, Kausar, & Younus, 2015). Adicionalmente, para que as NPP possuam as características idealizadas para uma determinada aplicação, a sua técnica de preparação é fundamental e, por essa razão, é indispensável ter à disposição diferentes técnicas de preparação das mesmas (Rao & Geckeler, 2011).

As NPP podem ser preparadas por duas principais vias, como se pode visualizar na figura 1. Uma das vias baseia-se na polimerização de monómeros, incluindo métodos químicos tais como a emulsão convencional, mini emulsão, micro emulsão, polimerização interfacial e polimerização por radicalização controlada/viva (C/LRP). A segunda via de preparação das NPP utiliza polímeros preformados, da qual fazem parte métodos físicos como a evaporação do solvente, nanoprecipitação, emulsão/difusão do solvente, *salting out*, diálise e a tecnologia de fluidos supercríticos (SCF) (Nagavarma et al., 2012; Nasir et al., 2015; Rao & Geckeler, 2011). É importante salientar que estas técnicas se destacam pela utilização de reagentes com baixa toxicidade, pelas vantagens económicas associadas à sua simplificação, segurança e reprodutibilidade, e pela sua otimização como forma de incrementar a eficiência de encapsulação das moléculas (Nagavarma et al., 2012).

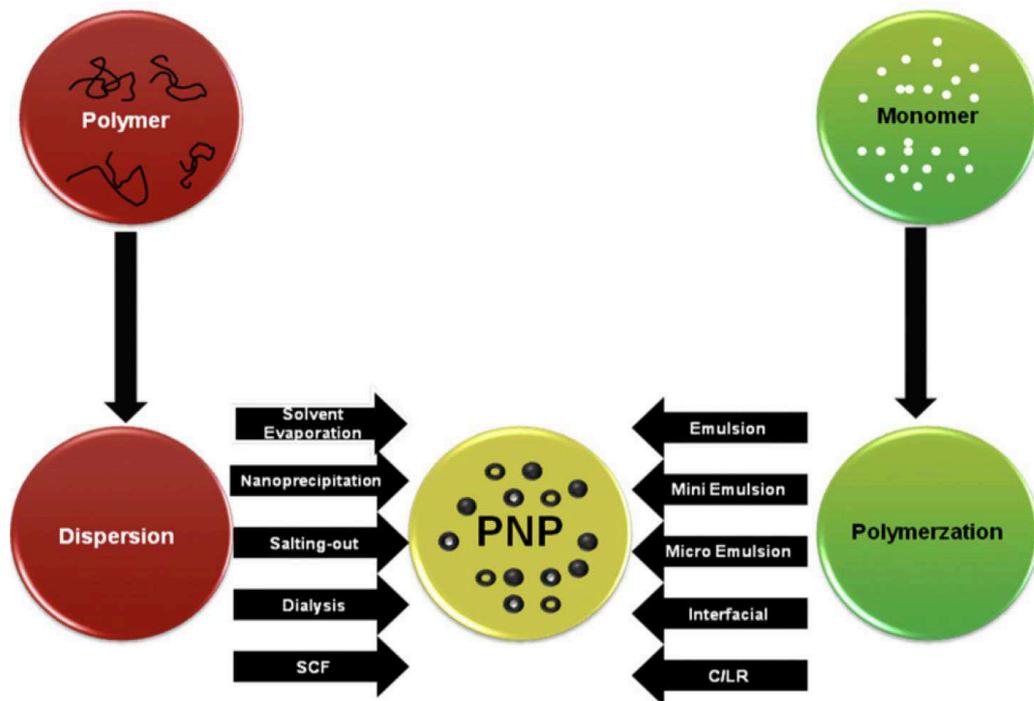


Figura 1: Representação esquemática das várias técnicas de preparação das NPP (Rao & Geckeler, 2011)

Consoante a técnica de preparação utilizada, as NPP podem ser classificadas em nanoesferas ou nanocápsulas (Fig. 2), as quais apresentam diferentes características e perfis de libertação (Dudhamal, Khadkutkar, & Bhang, 2015). As nanoesferas são

partículas esféricas e matriciais, amorfas ou cristalinas, que possuem uma estrutura homogênea. As moléculas são dispersas uniformemente na própria matriz polimérica, o que confere proteção contra a degradação química e enzimática (Singh, Garg, & Sharma, 2010). Já as nanocápsulas podem ser definidas como sistemas nano-vesiculares nos quais as moléculas são circunscritas a uma cavidade. Esta cavidade é constituída por um núcleo interno líquido e limitada por uma membrana polimérica. As nanocápsulas podem ainda transportar as substâncias à superfície ou, até mesmo, absorvidas na membrana polimérica (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010).

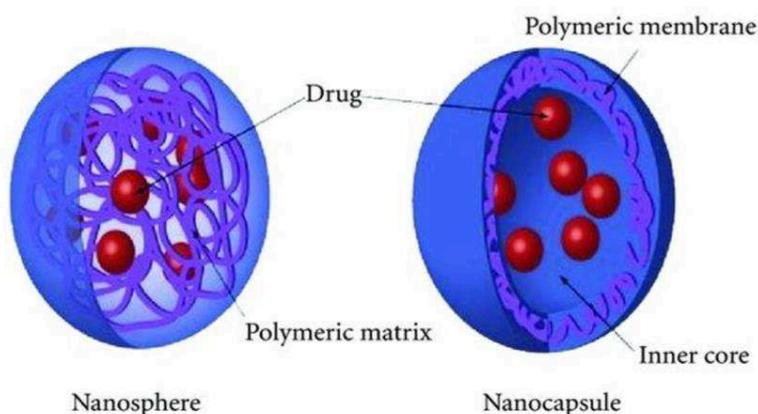


Figura 2: Diferenças entre nanoesfera e nanocápsula (Dudhamal et al., 2015)

É importante também salientar o papel fundamental que as características físico-químicas das NPP desempenham na obtenção do "nanosistema ideal". O tamanho, a forma e as características superficiais das NP afetam não só a absorção celular, mas também outros parâmetros como o tempo de circulação, a *clearance* e a biodistribuição seletiva.

O **tamanho** das partículas pode ser regulado tendo como base determinadas propriedades dos materiais, como o tipo de polímero, ou através de parâmetros experimentais relativos às técnicas de preparação. As NPP com tamanho entre 20-100 nm, quando adequadamente preparadas, são as que têm maior aplicabilidade *in vivo* devido ao prolongado tempo de circulação que possuem. As NPP com estas dimensões são suficientemente grandes para impedir a *clearance* renal e linfática, situação que ocorre com as NPP de dimensões menores (< 5nm), e suficientemente pequenas para

impedir a opsonização e consequente acumulação no fígado e baço, situação esta que ocorre com as NPP de maiores dimensões ($> 1\mu\text{m}$) (Banik et al., 2016; Elsabahy & Wooley, 2012).

A **forma**, tal como o tamanho, é uma característica primordial das NP, bastante relevante para as aplicações em nanomedicina. Tendo em conta a estrutura do polímero e a composição das NP podem obter-se NPP com várias formas, sendo a esférica a mais utilizada. Todavia, ao invés do tamanho, a ação biológica da forma das partículas é menos evidente, sendo que diversas pesquisas têm sido realizadas de modo a tentar compreender esta questão (Elsabahy & Wooley, 2012; Tao et al., 2011).

As **características superficiais** são também fatores decisivos para o comportamento e efeito das NP. A carga, a hidrofobia e, se aplicável, os grupos funcionais, são determinantes não só para a estabilidade, como também para a opsonização das NPP. Neste contexto, o PEG tem um papel de destaque, devido à sua capacidade em proporcionar uma superfície hidrofílica e proteção das NP face à opsonização. Adicionalmente, a escolha adequada de um ligando superficial de direcionamento, para determinada doença, tem o potencial de modificar a biodistribuição e a absorção das NPP, sendo crucial na melhoria da eficácia e toxicidade das mesmas (Desai, 2012).

As NPP são bastante vantajosas e têm um grande potencial, o que se reflete no crescente interesse que as suas aplicações em nanomedicina possuem. É importante salientar o seu *design* flexível que possibilita inúmeras aplicações; as diferentes técnicas de preparação, acessíveis e económicas, que facilitam uma produção alargada; a proteção que conferem contra a degradação, possibilitando que o alvo pretendido seja alcançado; a capacidade de veicularem fármacos para áreas anteriormente inacessíveis que leva a melhorias a nível da eficiência e eficácia da tradicional administração oral e intravenosa (IV); a menor incidência de efeitos adversos devido à limitada interação com as células saudáveis; e as várias vias de administração que podem ser utilizadas (apesar da via IV ser a mais comumente escolhida, outras menos invasivas, como a dérmica, oral e mucosa, podem ser também selecionadas) (Dudhamal et al., 2015; Elsabahy & Wooley, 2012; Nagavarma et al., 2012).

Porém, as NPP estão igualmente sujeitas a limitações e desafios, principalmente em termos de estabilidade, biodistribuição, *clearance* e nanotoxicidade, para os quais têm vindo a ser desenvolvidas algumas estratégias de resolução.

A **estabilidade** das NP tem repercussões em parâmetros como a toxicidade e a biodistribuição. De forma a maximizar a estabilidade, vários revestimentos têm sido formulados e aplicados à superfície das NP, com o objetivo de modificar as suas propriedades químicas superficiais, tal como referido anteriormente (Banik et al., 2016).

A **biodistribuição**, por sua vez, debruça-se sobre dois principais desafios. De um lado temos a veiculação das NPP para os locais pretendidos, do outro a sua acumulação em locais não planeados. Estes desafios podem ser influenciados por barreiras biológicas, o que poderá traduzir-se em doses de fármacos ou outras moléculas desadequadas da necessidade. A barreira hematoencefálica (BHE) e o microambiente tumoral, que serão abordados nesta revisão, são exemplos de barreiras bastante desafiantes nesta área. De forma a ultrapassar estas limitações, diversos ligandos e peptídeos têm sido utilizados com o objetivo de direcionar o transporte das NPP e permitir a sua subsequente passagem através de barreiras outrora impenetráveis, nas quais se inclui a BHE. Contudo, é ainda necessária muita investigação nesta área complexa (Banik et al., 2016).

A **clearance** é o resultado dos processos de opsonização e fagocitose. A ligação das opsoninas às NP facilita o reconhecimento destas pelos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear e a sua posterior remoção da circulação antes de desempenharem a função pretendida. Mascaram as NP é uma opção para ultrapassar este desafio e várias estratégias foram desenvolvidas neste contexto, sendo que a preferencial e mais utilizada é a adsorção de PEG à superfície das mesmas. Como resultado, verifica-se um aumento considerável da semivida de circulação das partículas e também uma redução da sua *clearance* (Owens & Peppas, 2006).

Por último, a **nanotoxicologia** surgiu conjuntamente com a nanomedicina e estuda as possíveis consequências das interações entre as NP e os sistemas biológicos. Algumas pesquisas preliminares revelaram que os nanomateriais poderão gerar radicais livres, lesões cerebrais e penetrar em locais não planeados e mais suscetíveis a toxicidade. Além disso, dependendo do seu tamanho, ao penetrarem nas células podem contactar com material genético. Assim, e de modo a salvaguardar a segurança, a existência de padrões e protocolos consensuais com a função de suportar novos materiais, são essenciais e necessários para o futuro (Bamrungsap et al., 2012).

Deste modo, é indiscutível a potencialidade da utilização das NPP em variadíssimas áreas, tendo estas um papel distinto e promissor na veiculação de fármacos, na medida em que melhoram a farmacocinética e farmacodinâmica dos mesmos. O seu sucesso deve-se não só ao seu tamanho reduzido (o que permite veicular as substâncias

para o alvo específico e uma eficiente acumulação das mesmas, traduzindo-se numa melhoria em termos de segurança), como também às propriedades de libertação controlada que possuem e, igualmente, à sua biocompatibilidade (Nagavarma et al., 2012; Parveen et al., 2012). O cancro, os distúrbios neurodegenerativos e as doenças infecciosas são alguns exemplos de patologias nas quais as NPP têm vindo a revelar o seu potencial como sistemas de veiculação de fármacos e que serão abordadas adiante.

Contudo, as NPP são também aplicadas com sucesso noutras áreas da medicina. A área do diagnóstico e, mais especificamente, a imagiologia, os pró-fármacos, a engenharia de tecidos e os *nanoheranostics* – sistemas destinados simultaneamente ao tratamento e diagnóstico – são algumas das aplicações médicas das NPP que também serão discutidas nesta revisão. É portanto fácil de perceber que o potencial que lhes está associado faz das NPP um desafio para a medicina moderna, devido essencialmente à capacidade que têm em conseguir soluções mais eficazes e seguras para as diversas limitações nas áreas da terapêutica e diagnóstico (Banik et al., 2016).

2. ÁREAS DE APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM MEDICINA

As NPP têm um grande impacto na medicina já que permitem ultrapassar diversas limitações inerentes a várias áreas. As vantagens da sua aplicação e os resultados positivos obtidos nas áreas do diagnóstico (e mais concretamente da imagiologia), dos pró-fármacos, dos *nanoheranostics* e da engenharia de tecidos e medicina regenerativa serão discutidos de seguida.

Tendo em conta a grande investigação das NPP como sistemas de veiculação de fármacos, e igualmente devido à importância que esta aplicação tem nas ciências farmacêuticas, a mesma será abordada em pormenor no capítulo seguinte.

2.1. Diagnóstico/Imagiologia

A imagiologia registou um forte crescimento durante as últimas décadas e várias técnicas, como a tomografia axial computadorizada (TAC), a ressonância magnética (RM) e a tomografia por emissão de positrões (PET) tornaram-se fundamentais na prática clínica. Estas técnicas imagiológicas permitem a visualização de todo o corpo humano, de forma não invasiva, através da interação de diferentes formas de energia com os tecidos. Deste modo, constituem ferramentas fundamentais para detetar e controlar alterações funcionais e biológicas no local de interesse, possibilitando a deteção de doenças numa fase inicial, o que confere um prognóstico muito mais favorável às mesmas (Lee et al., 2012; Rudin & Weissleder, 2003; Srikar, Upendran, & Kannan, 2014).

Porém, apesar das vantagens associadas às várias técnicas, estas possuem também algumas limitações tais como sensibilidade ou resolução espacial insuficientes, o que complexifica a obtenção de informações exatas e confiáveis do local alvo (Lee et al., 2012). Em adição, as tecnologias imagiológicas supramencionadas dependem, muitas vezes, de agentes de contraste para analisar o local pretendido sendo que estes, por sua vez, possuem baixa especificidade para o alvo e instabilidade *in vivo*. Por conseguinte, uma reduzida concentração de agentes de contraste no local alvo influencia a qualidade da imagem. Por essa razão, é crucial veicular seletivamente uma quantidade suficiente dos mesmos para se conseguir imagens clinicamente proveitosas.

De modo a ultrapassar as limitações existentes, os agentes de contraste incorporados em NPP têm vindo a destacar-se como um novo tipo de agentes imagiológicos, tendo já demonstrado vários benefícios nesta área. As NPP possibilitam a veiculação de elevadas concentrações de agentes de contraste para o local pretendido e possuem também a vantagem de serem multifuncionais. Esta característica permite a visualização em, pelo menos, duas modalidades de imagem (quando se encapsulam diferentes agentes de contraste dentro de uma única matriz) e funcionar como *theranostics*, o que possibilita conjuntamente o diagnóstico e terapêutica. Esta última aplicação será explorada com mais detalhe adiante. Assim, espera-se que os obstáculos do diagnóstico e da terapêutica sejam superados através da introdução de uma terapêutica adaptada a cada doente, designada por "medicina personalizada", conceito este que será também abordado mais à frente (Lee et al., 2012; Srikar et al., 2014).

As NPP aplicadas à imagiologia podem ser obtidas por conjugação covalente (Tipo I) ou encapsulação física (Tipo II) de agentes de imagem à matriz polimérica, tal como se pode observar na figura 3. No primeiro caso, os agentes de contraste são ligados de forma covalente ao polímero e, posteriormente, há conversão em NPP através de métodos convencionais. Esta ligação permite, assim, que a libertação antecipada do agente de contraste não ocorra. Por outro lado, nas NPP tipo II verifica-se uma encapsulação física do agente de contraste dentro das mesmas. Este processo é vantajoso devido à quantidade elevada de agentes de contraste que encapsula e à distribuição homogénea dentro da própria matriz.

Todavia, ainda é um grande desafio alcançar-se uma libertação controlada dos agentes de contraste no sistema biológico (Srikar et al., 2014).

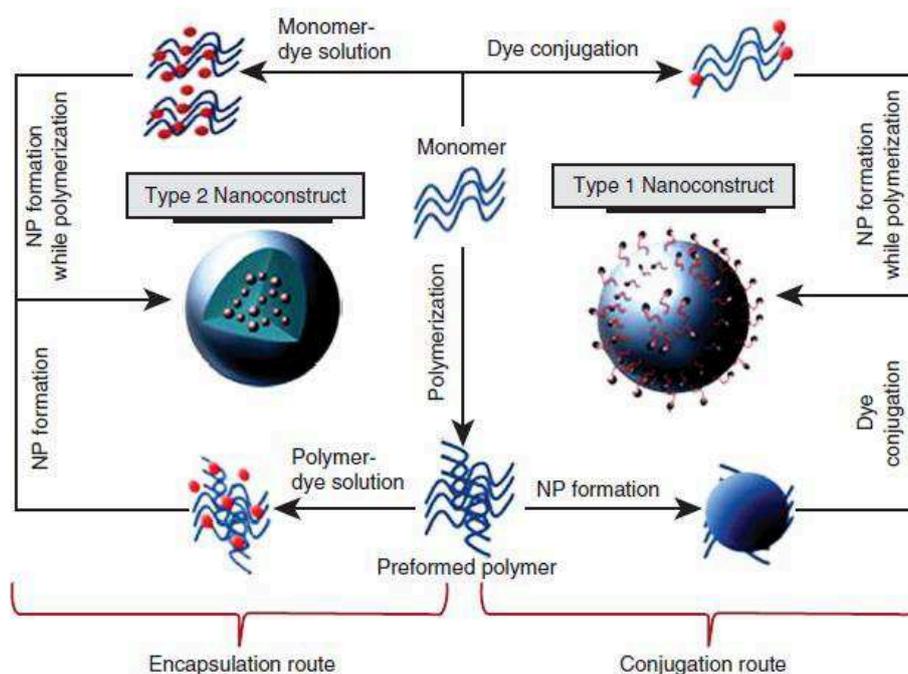


Figura 3: Vias de formação de NPP através de conjugação covalente (Tipo I) ou encapsulação física (Tipo II) de agentes de contraste à matriz polimérica, para aplicações imagiológicas (Srikar et al., 2014)

2.1.1. Tomografia axial computadorizada

A TAC é uma tecnologia que se baseia em Raios-X e que tem potencial para originar imagens tridimensionais com uma resolução espacial bastante favorável (deKrafft et al., 2009). No presente, é considerada uma das técnicas imagiológicas mais poderosas e, apesar da evolução de outras técnicas de diagnóstico não invasivo nesta área, a TAC continua a ser, muitas vezes, a predileta (Liu, Ai, & Lu, 2012).

De forma a garantir um adequado contraste entre o tecido alvo e os adjacentes, são utilizados na TAC agentes de contraste com elevada atenuação de Raios-X. Estes incluem compostos cujos elementos possuem um número atômico elevado. Atualmente, apenas os compostos iodados aromáticos e o sulfato de bário estão aprovados como agentes de contraste para TAC. Contudo, estas moléculas têm uma distribuição não específica e uma rápida *clearance*, bem como uma célere extravasão do sangue e vasos linfáticos o que pode limitar consideravelmente as possíveis aplicações da técnica. Elevadas doses de agentes imagiológicos são também necessárias para um contraste apropriado, o que se poderá traduzir em efeitos adversos nos pacientes (deKrafft et al., 2009; Liu et al., 2012).

Uma solução para os problemas descritos passa pela formulação dos agentes de contraste em NP. Deste modo, será possível uma apropriada acumulação no local de interesse já que, geralmente, as NP não difundem para o espaço extravascular nem possuem uma rápida *clearance* renal. Estas características possibilitam uma maior janela temporal para realizar a técnica e, conseqüentemente, um melhor contraste, recorrendo a uma menor dose. Mais especificamente, tem sido notório o progresso das NPP como agentes de contraste, bem como os benefícios clínicos associados às mesmas (deKrafft et al., 2009; Srikar et al., 2014).

Com o objetivo de ultrapassar os desafios acima descritos, Yin et al. (2013) sintetizaram NPP biocompatíveis de poli(io-hexol), a partir de io-hexol e diisocianato de hexametileno (DIH).

Uma vez que os agentes de contraste iodados têm normalmente vários grupos funcionais, uma estratégia para obter NPP com massa molecular elevada e considerável conteúdo em iodo passa pela ligação destes agentes de contraste. Posto isto, recorreu-se a um agente de imagem bastante usado na prática clínica, o io-hexol (que contém vários grupos hidroxilo) como monómero para obter poli(io-hexol), através de uma reação de adição com DIH. Posteriormente, formaram-se NPP com cerca de 150nm de diâmetro por nanoprecipitação com metoxi polietilenoglicol-ácido polilático (mPEG-PLA), como se pode observar na figura 4.

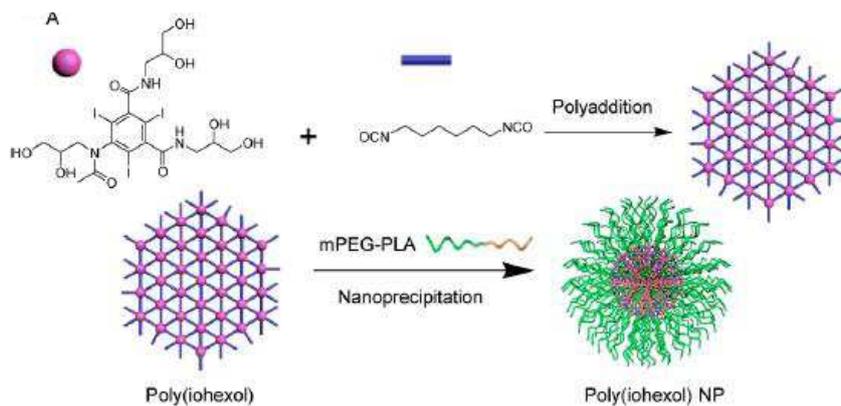


Figura 4: Representação esquemática da formação das NPP de poli(io-hexol) (Yin et al., 2013)

O potencial das NPP de poli(io-hexol) para o diagnóstico *in vivo* através da TAC foi analisado através da administração de uma solução das mesmas em coelhos brancos,

por quimioembolização transarterial. A distribuição das NPP foi monitorizada por TAC, tendo-se verificado uma nítida acumulação destas no parênquima hepático.

Realizou-se igualmente um estudo temporal, através da obtenção de várias imagens da TAC a intervalos de tempo específicos, de forma a avaliar a retenção prolongada das NPP de poli(io-hexol) comparativamente a io-hexol livre, nos tecidos tumorais de ratinhos, tal como se visualiza na figura 3. Os resultados são expressos em unidades de Hounsfield (UH), escala quantitativa que descreve a radiodensidade.

Cinco minutos após a injeção intratumoral de io-hexol foram detetados fortes sinais da TAC no tumor, com Δ UH (diferença no valor de UH antes e após a administração) de 101,0. Todavia, uma hora após a administração, o Δ UH diminuiu abruptamente para 26,1 e quatro horas depois o sinal tornou-se praticamente indetetável. Por outro lado, os ratos injetados com NPP de poli(io-hexol) em doses equivalentes ao io-hexol apresentaram um sinal da TAC semelhante (Δ UH de 104,4), cinco minutos após a administração. De acordo com o previsto, ocorreu uma retenção prolongada deste agente de contraste pelo tecido tumoral, registando-se um Δ UH de 80,2 e 53,7 uma e quatro horas após a administração, respetivamente.

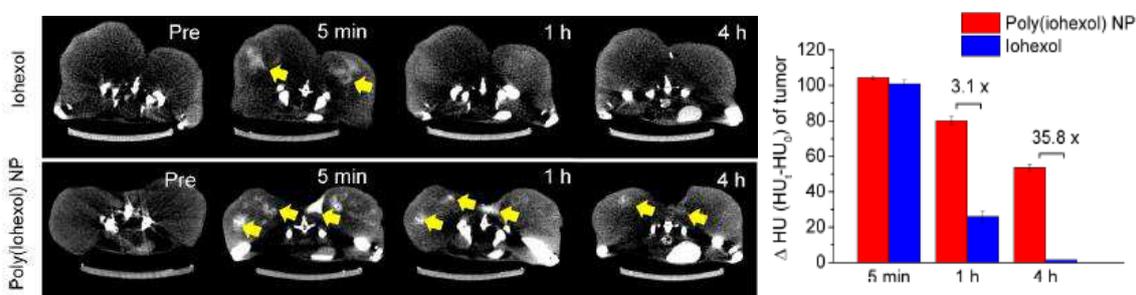


Figura 5: Imagens dos tecidos tumorais, obtidas através da TAC, anterior e posteriormente à administração de io-hexol e NPP de poli(io-hexol), a vários tempos (à esquerda). Valores de Δ UH 5 minutos, 1h e 4h depois da administração de io-hexol e NPP de poli(io-hexol) (à direita) (Yin et al., 2013)

Pela análise da figura 5 é também possível concluir que o sinal da TAC nos tecidos tumorais de ratinhos injetados com NPP de poli(io-hexol) foi cerca de 36 vezes superior comparativamente aos ratos injetados com io-hexol, 4 h após a administração.

Além disso, após administração IV, as NPP registaram uma semivida de circulação superior (15,9 h) em comparação com o io-hexol (3,8 h). Consequentemente,

a *clearance* renal e tecidual destes agentes de contraste demonstraram ser surpreendentemente diferentes.

Deste modo, pode então concluir-se que as NPP de poli(io-hexol), comparativamente com io-hexol, possibilitam períodos mais longos de imagem e obtenção de dados, levando a um diagnóstico mais exato sem se recorrer a diversas administrações de agentes de contraste. Além disso, os estudos de toxicidade realizados *in vivo* revelaram que estas NPP possuem um elevado perfil de segurança, o que constitui outra vantagem destes potenciais agentes de contraste (Yin et al., 2013).

Também nesta área, de Vries et al. (2010) descreveram o desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões radiopacas iodadas, como potenciais agentes de contraste da TAC. Foram preparados três óleos iodados hidrofóbicos, que constituem o núcleo radiopaco das emulsões, tendo como referência o composto 2,3,5-triidobenzoato (óleo 1, 2 e 3). Estes óleos foram posteriormente emulsionados através de três diferentes tipos de tensoativos, o fosfolípido DSPC, o poli(óxido de etileno)-b-poli(óxido de propileno)-b-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO; Pluronic F68) e, por último, o polímero poli(butadieno)-b-poli(óxido de etileno) (PBD-PEO). Na figura 6 estão representadas as diversas estruturas dos óleos iodados em estudo.

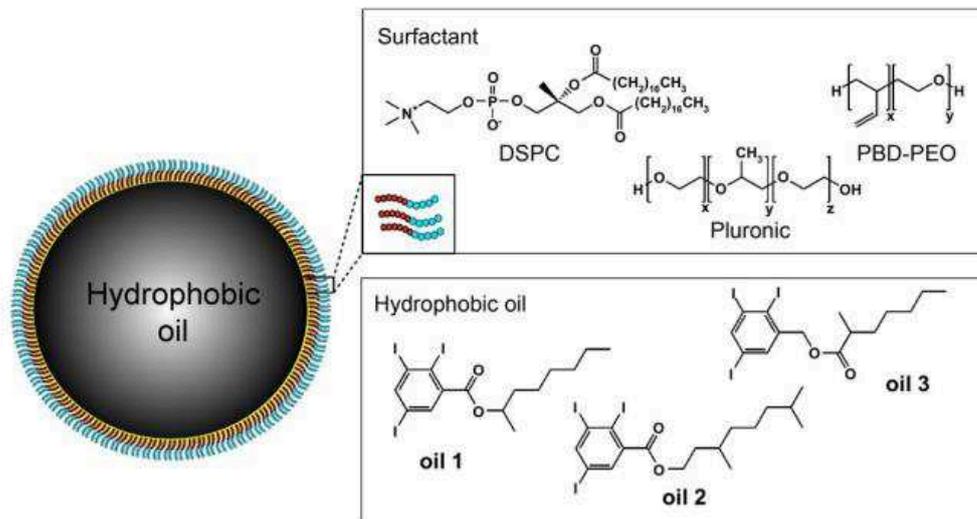


Figura 6: Representação esquemática das nanoemulsões estabilizadas como agentes de contraste da TAC, mostrando os vários tipos de tensoativos e óleos hidrofóbicos (de Vries et al., 2010)

Através dos estudos de estabilidade *in vitro* realizados concluiu-se que a natureza do óleo iodado e, principalmente, o tensioativo têm influência no tamanho e estabilidade das NP. Os agentes de contraste formulados foram pormenorizadamente caracterizados e as melhores emulsões (DSPC-óleo 1, PBD-PEO-óleo 1, PBD-PEO-óleo 2) foram posteriormente testadas *in vivo* em ratinhos. A escolha destas emulsões baseou-se na estabilidade prolongada que apresentavam em comparação com Pluronic e ao tamanho inferior das partículas geradas. A partir destas emulsões analisou-se a semivida na circulação e o contraste gerado pelas mesmas.

As emulsões estabilizadas com lípidos revelaram ser instáveis *in vivo* todavia, as emulsões estabilizadas com polímeros apresentaram um bom desempenho nas mesmas condições. A emulsão PBD-PEO-óleo 2 gerou um notável contraste *in vivo* (um aumento de contraste de 190 UH foi medido após administração IV de 520 mg I/kg) e revelou ter um tempo de circulação prolongado (~3h), não havendo indícios de toxicidade *in vivo*.

Posto isto, conclui-se que as emulsões do óleo iodado 2, estabilizadas com o polímero PBD-PEO são uma hipótese interessante como agente de contraste para imagiologia através da TAC (de Vries et al., 2010).

2.1.2. Ressonância Magnética

A ressonância magnética (RM) é considerada, tal como a TAC, uma poderosa e vantajosa técnica de diagnóstico já que tem a capacidade de fornecer imagens tridimensionais, principalmente de tecidos moles humanos, com elevada resolução espacial. Estas imagens são conseguidas através de diferenças na densidade de prótons, que permitem a diferenciação de tecidos normais e doentes. Além disso, na RM não é necessário o uso de radiação ionizante ou radioisótopos sendo, por essa razão, uma opção de destaque para a imagiologia do coração, cérebro e SNC. No entanto, a baixa sensibilidade que lhe está associada poderá dificultar a deteção e visualização de pequenas modificações nos tecidos. Para ultrapassar esta limitação e melhorar a sensibilidade, são frequentemente utilizados agentes de contraste de RM, que serão abordados de seguida (Lee & Hyeon, 2012; Srikar et al., 2014; Zhu, Liu, Ma, Liu, & Wang, 2013).

Esta técnica tem por base a resposta rotacional de prótons na presença de um campo magnético externo, quando acionado por um pulso de radiofrequência (RF).

Através da ação deste campo magnético, os prótons alinham-se segundo uma determinada direção. Aquando da aplicação do pulso de RF há uma perturbação dos prótons alinhados e, posteriormente, estes relaxam novamente para o seu estado inicial. O relaxamento dos prótons pode dar-se a partir de dois processos distintos, o longitudinal (T1) e o transversal (T2). Os agentes de contraste, por sua vez, conduzem a alterações de densidade de prótons nos processos de relaxamento T1 e T2, colaborando no reconhecimento de lesões (Srikanth et al., 2014; Zhu et al., 2013).

Deste modo, existem dois tipos de agentes de contraste de RM, os agentes de contraste com natureza paramagnética T1, que aumentam o tempo de relaxamento T1 e os agentes de contraste superparamagnéticos T2 que reduzem os tempos de relaxamento T2. Os primeiros baseiam-se principalmente em quelatos de gadolínio (Gd^{3+}) e resultam em imagens com contraste brilhante. Estes quelatos de gadolínio, tais como o Gd-DTPA (ácido Gd-dietilenotriaminopentaacético) são bastante usados, contudo estão-lhes associadas algumas limitações. Além de possuírem uma sensibilidade relativamente baixa (pelo que é necessária uma elevada dose dos mesmos), têm uma rápida *clearance* renal, o que reduz a janela temporal para a realização da RM.

Por outro lado, os agentes T2 têm por base NP de óxido de ferro (Fe_3O_4) e dão origem a imagens com contraste escuro. Em comparação com os agentes de contraste T1, são vantajosos devido à sua alta sensibilidade porém, resultam em imagens escuras, o que poderá dificultar o correto diagnóstico.

De forma a ultrapassar estas limitações, as NPP biocompatíveis têm demonstrado ser uma mais-valia nesta área. Por essa razão, têm vindo a ser estudadas para o transporte seletivo de agentes de contraste tipo T1 ou T2 (Lee & Hyeon, 2012; Srikanth et al., 2014; Zhu et al., 2013).

Neste contexto, Liu et al. (2011) desenvolveram um agente de contraste de RM utilizando ácido polilático-polietilenoglicol-poli-L-Lisina (PLA-PEG-PLL) conjugado covalentemente com Gd-DTPA e com o anticorpo anti-fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Desta forma, obtiveram-se NPP multifuncionais anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd. Estas NPP têm como objetivo a veiculação ativa de Gd-DTPA especificamente para o local do tumor de modo a conseguir-se um diagnóstico precoce do carcinoma hepatocelular (CHC), uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo.

O anti-VEGF foi eleito como agente de direcionamento já que o VEGF é um marcador muito relevante no CHC, verificando-se uma sobreexpressão do mesmo nesta

patologia. Células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e células de carcinoma hepatocelular de rato (H22) foram selecionadas como modelos celulares para a sobreexpressão membranar de VEGF.

A citotoxicidade, a eficiência do direcionamento para o alvo de interesse e a capacidade de imagem destas NPP foram avaliadas *in vitro* e *in vivo*.

As NPP anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd demonstraram possuir um elevado relaxamento T1 e nenhuma citotoxicidade nas concentrações utilizadas, em células HepG2. Os resultados experimentais da absorção celular *in vitro* revelaram que a absorção das NPP era igualmente dependente da concentração e do tempo. Em adição, as NPP modificadas com anticorpos anti-VEGF apresentaram uma absorção celular superior em células HepG2 quando comparadas com NPP não-direcionadas (PLA-PEG-PLL-Gd).

Ratinhos injetados subcutaneamente com células H22 foram utilizados para avaliar a biodistribuição e a eficiência do direcionamento, comparando as NPP de PLA-PEG-PLL-Gd, as NPP anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd e Magnevist®, um convencional agente de contraste de RM. As NPP anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd revelaram um aumento significativo da intensidade do sinal no local do tumor, comparativamente com NPP não direcionadas (PLA-PEG-PLL-Gd) e com o Magnevist, como é possível concluir observando a figura 7. Consequentemente, o tempo de imagem foi significativamente prolongado para 12 horas em comparação com o Magnevist (1 hora).

Os resultados obtidos comprovam assim que o agente de contraste de RM desenvolvido, baseado em NP de anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd, poderá ser bastante poderoso e benéfico para o diagnóstico prematuro de tumores hepáticos (Liu et al., 2011).

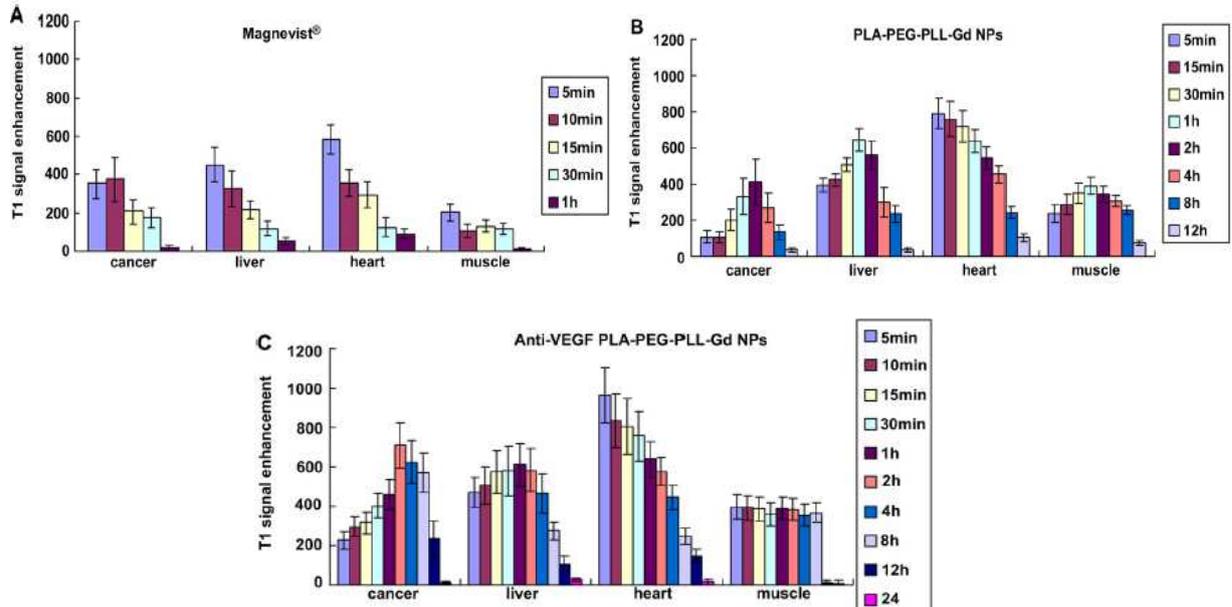


Figura 7: Resultados do sinal da RM em diferentes tecidos *in vivo* (Magnevist (A), NP PLA-PEG-PLL (B) e NP Anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd (C)) (Liu et al., 2011)

Zhang et al. (2014) fizeram também progressos nesta área, desenvolvendo um agente de contraste insolúvel para RM baseado em NPP de ácido gordo (AG), encapsuladas com quelatos Gd-DTPA, para a identificação precoce de pancreatite aguda (PA). As NPP Gd-DTPA-AG foram obtidas por conjugação do ligando DTPA-AG e acetato de gadolínio.

Quando a PA ocorre, grandes quantidades de lípases são libertadas especificamente no local lesado do pâncreas. O objetivo deste estudo é, portanto, o desenvolvimento de agentes de contraste de Gd, sujeitos a ativação condicional, através da atividade das lípases no tecido pancreático e em modelos de células de ratos cuja PA foi induzida por L-arginina. Nesta abordagem, os quelatos insolúveis (e, portanto, inativos) de Gd são ativados por clivagem enzimática, havendo hidrólise dos seus grupos de proteção. Após a hidrólise enzimática pelas lípases, as NPP Gd-DTPA-AG hidrofóbicas são convertidas num complexo de Gd-DTPA solúvel em água, resultando em alterações nas intensidades de sinal observadas com a RM *in vitro* (há um aumento no T1).

Quando analisadas *in vitro* e *in vivo*, as NPP Gd-DTPA-AG apresentaram reduzida citotoxicidade e biocompatibilidade favorável. A PA foi detetada em ratos por imunohistoquímica e imunofluorescência da lípase, 1 h após a sua indução (através de

duas injeções de L-arginina (250 mg/100 g de peso corporal)). Após a administração de Gd-DTPA-AG foi detetada, através de RM, uma considerável acumulação deste agente no pâncreas, em estádios iniciais de PA em ratos. A L-arginina levou a um aumento gradual da intensidade do sinal da RM (T1) de 1h para 36h, nos modelos de ratos com PA. Porém, o aumento da intensidade do sinal foi mais significativo às 1 h, 6 h e 12 h.

Os resultados obtidos permitem concluir que as NPP Gd-DTPA-AG, como agentes de contraste de RM, possuem grande eficiência e especificidade para detetar PA numa fase inicial. Esta abordagem fornece um suporte experimental para o diagnóstico e tratamento de outras patologias, através da aplicação de métodos idênticos de ativação enzimática (Zhang et al., 2014).

2.2. Pró-Fármacos

Os pró-fármacos são derivados quimicamente modificados e bioreversíveis de fármacos que têm como objetivo auxiliar os mesmos a ultrapassar determinadas barreiras fisiológicas. Uma vez *in vivo*, são sujeitos a uma transformação enzimática e/ou química com o objetivo de libertar o fármaco original (ativo), ficando este apto a desempenhar a ação farmacológica pretendida. Na figura 8 é possível visualizar a estrutura e funcionamento de um pró-fármaco.

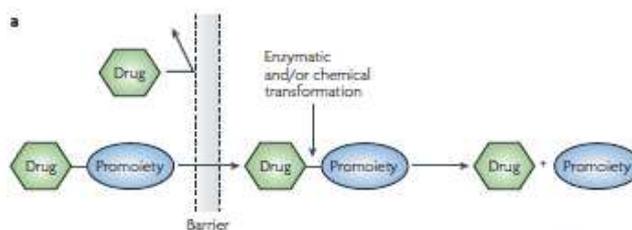


Figura 8: Representação esquemática do funcionamento de um pró-fármaco (Rautio et al., 2008)

Os pró-fármacos adequadamente formulados possibilitam a melhoria de características de moléculas farmacologicamente potentes o que se traduz num aumento do desenvolvimento e utilidade de potenciais fármacos. A baixa solubilidade do fármaco, a conversão em metabolitos inativos, bem como a falta de especificidade para o alvo de

interesse e a insuficiente absorção celular, são algumas das características que muitas vezes podem ser melhoradas (Bildstein, Dubernet, & Couvreur, 2011; Rautio et al., 2008).

É importante referir também que o *design* de um pró-fármaco deve ser ponderado no início do desenvolvimento pré-clínico, uma vez que esta estrutura pode modificar tanto a distribuição tecidual e a eficácia do fármaco original, como também a sua toxicidade. Usualmente, os grupos funcionais carboxílico, hidroxilo, amina, fosfato/fosfonato e carbonilo são utilizados no *design* de pró-fármacos (Rautio et al., 2008).

Os pró-fármacos constituem, atualmente, uma das estratégias para aumentar a eficácia dos agentes anticancerígenos existentes. Embora tenham sido identificados e efetivamente utilizados um número considerável de agentes anticancerígenos potentes, continua a haver uma enorme pesquisa dedicada à descoberta de tratamentos que aliem uma elevada eficácia e reduzidos efeitos adversos. Além disso, a falta de seletividade para as células cancerígenas leva a que uma grande parte destes fármacos possua uma janela terapêutica estreita, o que se torna numa limitação (Bildstein et al., 2011).

A cisplatina, por exemplo, é um agente citostático utilizado no tratamento de diversos tumores. Contudo, apresenta uma elevada toxicidade e resistência (intrínseca ou adquirida) que restringem o seu uso em vários tipos de cancro, como o da próstata. Sendo a cisplatina o fármaco mais potente dos anticancerígenos derivados da platina (Pt), a possibilidade de ser utilizado no cancro da próstata suscita bastante interesse.

A identificação de antigénios específicos para o tumor pretendido constitui uma opção para o tratamento de alguns tipos de cancro, já que poderá permitir uma terapêutica direcionada. No caso do cancro da próstata, o antigénio membranar específico da próstata (PSMA), uma proteína membranar tipo II, é abundantemente expresso tornando-se, por isso, numa possibilidade bastante atrativa (Dhar, Gu, Langer, Farokhzad, & Lippard, 2008).

Face a esta situação, Dhar et al. (2008) desenvolveram um pró-fármaco de Pt(IV), encapsulado em NPP de PLGA-b-PEG direcionadas para o PSMA, de forma a veicular cisplatina a células cancerígenas da próstata. Uma vez que as características físico-químicas da cisplatina comprometem a sua encapsulação em NPP, a utilização de um pró-fármaco de Pt(IV) contorna esta situação, permitindo que uma dose letal do fármaco atinja o alvo pretendido, após uma reação de redução intracelular (figura 9).

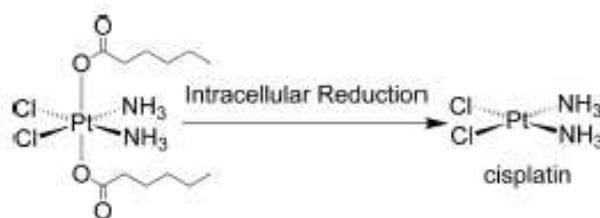


Figura 9: Estrutura química do composto hidrofóbico de Pt(IV) (à esquerda) e reação química de redução através da qual é obtido o fármaco ativo, cisplatina (Dhar et al., 2008)

O composto de Pt(IV) é fisicamente disperso por encapsulação no núcleo hidrofóbico das NPP. Estas NPP ligam-se ao PSMA na superfície de células cancerígenas, para veiculação direcionada do pró-fármaco Pt(IV) e posterior libertação da cisplatina. Para se atingir o alvo terapêutico, utilizou-se um aptâmero (apt) de RNA à superfície das NPP (A10 2' fluoropirimidina) que reconhece o domínio extracelular do PSMA. Na figura 10 está esquematicamente representado o processo de formação das NPP em estudo.

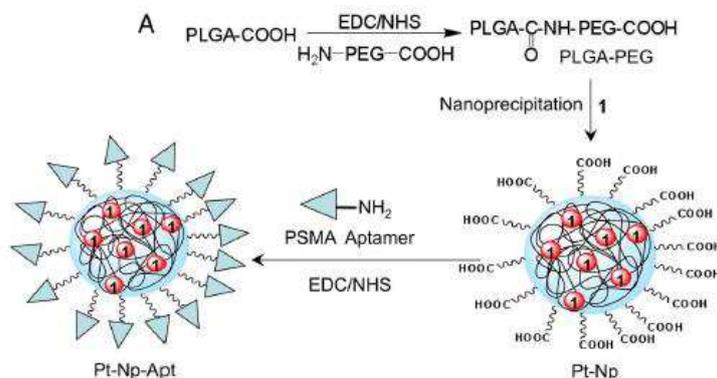


Figura 10: Representação esquemática das NPP de Pt(IV) direcionadas (Dhar et al., 2008)

Normalmente, a libertação a partir das NPP é um processo moroso, controlado por difusão, que varia com a taxa de biodegradação do polímero. A quantidade de Pt libertada a partir das NPP foi controlada *in vitro*, a uma temperatura de 37°C e pH=7,4 de forma a simular as condições fisiológicas. Como se pode ver pela figura 11, a libertação do pró-fármaco alongou-se por mais de 60h o que confirma a eleição do composto de platina (IV) para a formulação de uma estrutura Pt-NPP de libertação controlada.

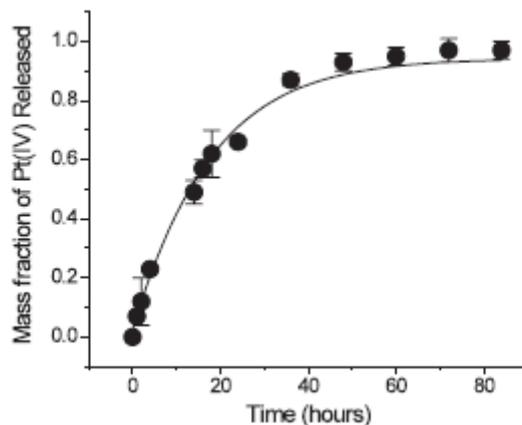


Figura 11: Cinética de liberação *in vitro* do pró-fármaco encapsulado a partir das NPP, a pH 7,4 e 37°C (Dhar et al., 2008)

Vários estudos foram também realizados no sentido de perceber o mecanismo de absorção destas NPP. Através de microscopia de fluorescência, verificou-se uma absorção via endocitose do complexo Pt-NPP-Apt por células cancerígenas da próstata que expressam PSMA.

Neste sentido, é também importante realçar que as células epiteliais da próstata humana LNCaP expressam, à sua superfície, um elevado nível de PSMA todavia, o mesmo não ocorre com as células epiteliais da próstata humana PC3. Posto isto, as células LNCaP (PSMA⁺) e PC3 (PSMA⁻) foram analisadas para comparativamente avaliar a absorção das NPP em estudo. Recorrendo à microscopia de fluorescência foi possível verificar que a incubação de células LNCaP com as NPP em estudo, durante 2 h, revelou total internalização das mesmas, por endocitose mediada pelo recetor. Por outro lado, não houve uma acumulação considerável de NPP nas células PC3, o que confirma a ligação e absorção diferencial destas NPP direcionadas ao PSMA.

Foram igualmente realizados diversos testes de citotoxicidade *in vitro* de forma a analisar o potencial anticancerígeno das NPP de Pt(IV) direcionadas, recorrendo a células LNCaP e PC3, e comparando a sua eficácia com a cisplatina. Concluiu-se que o composto Pt-NPP-Apt revela elevada toxicidade para as células LNCaP, que expressam o antigénio PSMA, registando um valor de IC₅₀ de 0,03 µM. Ainda nestas células, as NPP não direcionadas (Pt-NPP) e a cisplatina obtiveram, respetivamente, um valor IC₅₀ de 0,13 µM e 2,4 µM, revelando-se, portanto, menos efetivas. Nas células PC3, o IC₅₀ do composto Pt-NPP-Apt é de 0,11 µM, comparável ao valor de 0,12 µM obtido pelas

partículas não direcionadas (Pt-NPP), o que se justifica pela reduzida expressão de PSMA nestas células. A cisplatina, nestas condições, registou um IC₅₀ de 0,18 µM.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as NPP de PLGA-b-PEG encapsuladas com o pró-fármaco de Pt(IV) e direcionadas para o PSMA são cerca de 80 vezes mais tóxicas que a cisplatina livre, nas células LNCaP. Estas NPP demonstraram, assim, ser bastante promissoras para o tratamento do cancro da próstata humano, um dos mais comuns e com maior mortalidade no presente (Dhar et al., 2008).

2.3. *Nanotheranostics*

Os resultados favoráveis já alcançados com NP monofuncionais têm servido como base para a criação de *nanotheranostics*, isto é, NP com funções de diagnóstico (não invasivo) e terapêutica, simultaneamente. Os *nanotheranostics* possibilitam não só o diagnóstico imagiológico e o tratamento de várias patologias, como também possuem a capacidade de prever e confirmar a eficácia da terapêutica, controlando a libertação e distribuição dos fármacos, em tempo real (Mura & Couvreur, 2012).

Tal como foi referido anteriormente, estas estruturas multifuncionais são bastante promissoras no âmbito da (nano) medicina personalizada. Porém, conseguir um elevado desempenho de ambas as funções *in vivo*, numa única NP, é bastante complexo. A medicina personalizada pressupõe uma terapêutica otimizada a cada paciente, tendo em atenção a variabilidade individual. A aplicação dos *nanotheranostics* na prática clínica permitiria a precoce deteção e tratamento de diversas patologias, bem como uma avaliação antecipada da resposta à terapêutica. Deste modo, seria possível selecionar os pacientes que melhor respondessem à terapêutica e com maior perspectiva de obterem resultados benéficos. Assim, os *nanotheranostics* constituem ferramentas aliantes para criar protocolos terapêuticos individualizados, de forma a alcançar a maior eficácia terapêutica aliada a um elevado perfil de segurança, tendo a sua aplicação no cancro e outras doenças graves bastante relevância (Li et al., 2014; Mura & Couvreur, 2012).

Embora impressionantes, estas estruturas estão ainda numa fase primitiva de desenvolvimento e investigação, sem provas *in vivo* da sua aplicação. Diversos tipos de NP orgânicas e inorgânicas foram sugeridas para a sua formulação no entanto, todas elas apresentam benefícios e limitações próprias. É essencial o desenvolvimento de nanoestruturas biocompatíveis que integrem várias modalidades de imagem e terapêutica,

inovadoras e relevantes na prática clínica. Para atingirem as funções pretendidas, as NP devem ter uma preparação relativamente simples e serem formuladas de modo a superarem barreiras biológicas *in vivo*. Adicionalmente devem também ter a capacidade de veicular fármacos e agentes imagiológicos de forma eficiente e direcionada para os tecidos alvo (Li et al., 2014; Mura & Couvreur, 2012).

De forma a demonstrar os benefícios dos *nanotheranostics*, Shalviri, Flotz, Cai, Rauth e Wu (2013) desenvolveram um sistema polimérico multifuncional com funções de imagem através de RM (pela veiculação de Gd^{3+}) e veiculação de doxorrubicina (Dox), simultaneamente. Este revelou a sua potencial capacidade para libertação da Dox em função do pH e, conseqüentemente, melhoria da resistência a múltiplos fármacos no cancro da mama.

O polímero foi obtido a partir da polimerização de ácido polimetacrílico (APMA) e polissorbato 80 em amido, previamente conjugado com vários grupos de DTPA para a quelação de Gd^{3+} (formando NPP PolyGd). A Dox liga-se posteriormente à cadeia de APMA formando NPP estáveis (PolyGd-Dox).

As características deste sistema como agente de contraste de RM, tais como a estabilidade, o relaxamento T1 e a citotoxicidade, foram analisadas *in vitro*. Recorrendo a ratos portadores de tumores, foram avaliadas *in vivo* as propriedades farmacocinéticas e de contraste de PolyGd e PolyGd-Dox.

É importante salientar que a libertação da Dox, a partir das NPP, é controlada e varia com o pH. A pH 7,4, e durante 24 horas, cerca de 27% do fármaco foi libertado. Já a pH 5, mais de 40% da Dox foi libertada. Verifica-se uma maior taxa de libertação da Dox a pH ácido já que há uma menor interação Dox-polímero.

O polímero incorporado com Gd^{3+} revelou ainda ter elevada estabilidade e reduzida citotoxicidade. A toxicidade de PolyGd foi avaliada *in vitro*, usando hepatócitos de ratos isolados, por comparação a Gd^{3+} livre. Como se pode concluir pela figura 12, com Gd^{3+} livre verificou-se uma considerável toxicidade hepatocitária que resultou, após exposição a 1,5 mg/ml de solução de Gd^{3+} durante 240 min, numa sobrevivência de hepatócitos inferior a 15%. Sob as mesmas condições, a exposição de hepatócitos a PolyGd resultou em 65% de sobrevivência dos mesmos.

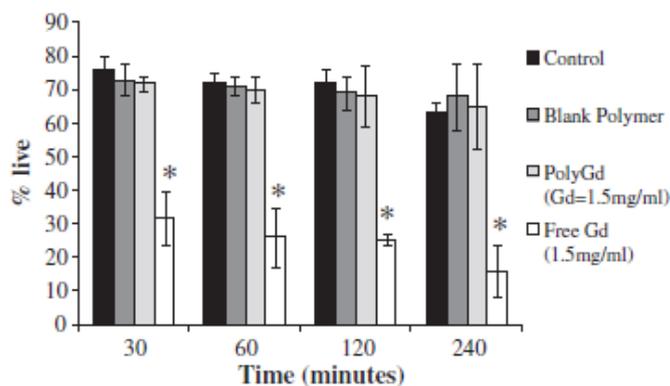


Figura 12: Toxicidade hepatocitária entre o grupo controlo, PolyGd e Gd^{3+} livre após exposição durante 30, 60, 120 e 240 minutos aos compostos. “% live” corresponde à percentagem de hepatócitos não afetados (Shalviri et al., 2013)

Adicionalmente, PolyGd e as NPP PolyGd-Dox aumentaram consideravelmente os sinais de RM, com relaxamentos T1 3-5 vezes superiores comparativamente ao Omniscan®, um agente de contraste usado na prática clínica. Várias imagens foram obtidas *in vivo*, por RM, após administração de Omniscan®, PolyGd e PolyGd-Dox a ratinhos. A uma dose de 0,025 mmol/kg Gd^{3+} , 4 vezes inferior à de Omniscan®, tanto PolyGd como PolyGd-Dox produziram um contraste superior e prolongado em relação ao agente de contraste, sem efeitos adversos. Verificou-se também uma acumulação de PolyGd e PolyGd-Dox no tumor e respetiva periferia durante um mínimo de 48 h.

Assim sendo, é possível concluir que PolyGd e PolyGd-Dox possuem elevada capacidade para melhorar a imagiologia e os *nanotheranostics*, através da veiculação simultânea de agentes de contraste de RM e diferentes fármacos. É possível recorrer a este sistema para avaliar, de forma não invasiva, a biodistribuição e acumulação de agentes terapêuticos, antecipar a resposta terapêutica e controlar a eficácia da intervenção terapêutica em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos (Shalviri et al., 2013).

2.4. Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos (ET) e a medicina regenerativa são áreas multidisciplinares centradas na evolução e utilização do conhecimento em diversos campos, para a obtenção de substitutos funcionais para tecidos danificados ou doentes. O

desenvolvimento destes substitutos tem como objetivo restaurar, substituir, manter ou melhorar a função dos tecidos e órgãos.

Tal como é demonstrado na figura 13, a pesquisa efetuada nesta área foca-se essencialmente em três componentes cruciais – *scaffolds*, células pluripotentes e fatores de crescimento – com o objetivo de se produzir estruturas funcionais semelhantes aos tecidos originários. Os *scaffolds* são substratos biodegradáveis que fornecem a base para o crescimento celular, proliferação e formação de novos tecidos. Para isso, são semeados com células pluripotentes, tendo estas a capacidade de diferenciação e formação do novo tecido. Por sua vez, os fatores de crescimento são também essenciais, na medida em que controlam os processos de diferenciação e proliferação (Armentano, Dottori, Fortunati, Mattioli, & Kenny, 2010; Shi, Votrubá, Farokhzad, & Langer, 2010; Vieira, Vial, Reis, & Oliveira, 2017).

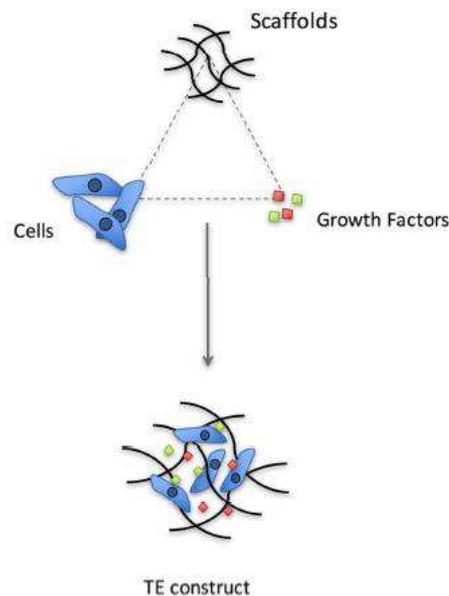


Figura 13: Estratégia utilizada na engenharia de tecidos (Vieira et al., 2017)

No interior dos tecidos, as células são limitadas por uma matriz extracelular (MEC), constituída por uma rede natural de nanofibras organizadas. Além de fornecer suporte celular e orientar o comportamento das células através de interações célula-MEC, esta desempenha também um papel indispensável no armazenamento, libertação e

ativação de variadíssimos fatores biológicos. Assim, o potencial para desenvolver biomateriais que mimetizem a funcionalidade da MEC é fundamental para a adequada regeneração dos tecidos. Estes biomateriais desempenham um papel primordial sobretudo na obtenção de *scaffolds* possibilitando, deste modo, obter microambientes sintéticos da MEC, tal como pretendido (Ma, 2008; Shi et al., 2010).

Na ET são igualmente notórios os recentes avanços na nanotecnologia, que possibilitam o desenvolvimento de novos sistemas que reproduzem a complexa estrutura do tecido original. Mais concretamente, as NP podem ser usadas na ET através de variadas aplicações, desde sistemas de veiculação de fármacos e genes, até à construção de *scaffolds* biomiméticos.

Diversas estratégias na ET têm por base as características dos *scaffolds*, dado a importância destes no fornecimento do suporte para o crescimento celular, tal como foi referido. Estas estratégias têm o intuito de obter um implante para substituir o tecido originário, suportando o processo de regeneração sem complicações (Armentano et al., 2010; Vieira et al., 2017). Os *scaffolds* nanofibrosos estão sujeitos a uma vasta investigação, uma vez que possuem uma estrutura física análoga às nanofibras proteicas da MEC. Por sua vez, os *scaffolds* baseados em nanocompósitos poliméricos são igualmente muito atraentes na ET, sobretudo para a reconstrução do tecido ósseo. Estes últimos são o resultado da combinação de polímeros (sintéticos ou naturais) e substâncias como a hidroxiapatite, NP metálicas e nanotubos de carbono, à escala nanométrica. Visto que a matriz óssea natural é um compósito orgânico/inorgânico constituído por colagénio e minerais (apatites), os materiais compósitos são escolhas acertadas como *scaffolds* para a engenharia do tecido ósseo.

Por outro lado, conseguir uma veiculação localizada e controlada de fatores biológicos em *scaffolds* 3D constitui outro aspeto crucial para a regeneração e crescimento tecidual. A encapsulação de biomacromoléculas por incorporação direta ou conjugação química aos *scaffolds* pode possibilitar uma libertação controlada das mesmas porém, a capacidade de controlar a cinética de libertação é limitada. Por conseguinte, NPP incorporadas com fatores de crescimento têm vindo a demonstrar os seus benefícios nesta área. Os fatores biológicos (um ou vários) podem ser libertados segundo um controlo temporal e espacial e, além disso, a cinética de libertação de cada fator pode ser controlada singularmente usando uma formulação nanoesférica própria (Armentano et al., 2010; Ma, 2008; Murugan & Ramakrishna, 2005; Shi et al., 2010).

Neste contexto, Kim et al. (2014) desenvolveram nanoesferas de sílica mesoporosas encapsuladas em biopolímeros (PLA ou PEG) e incorporadas dentro de um *scaffold* 3D espumoso de colagénio para a veiculação sequencial e a longo prazo de fatores de crescimento. Através da figura 14 é possível perceber o mecanismo de formação das nanoesferas em estudo.

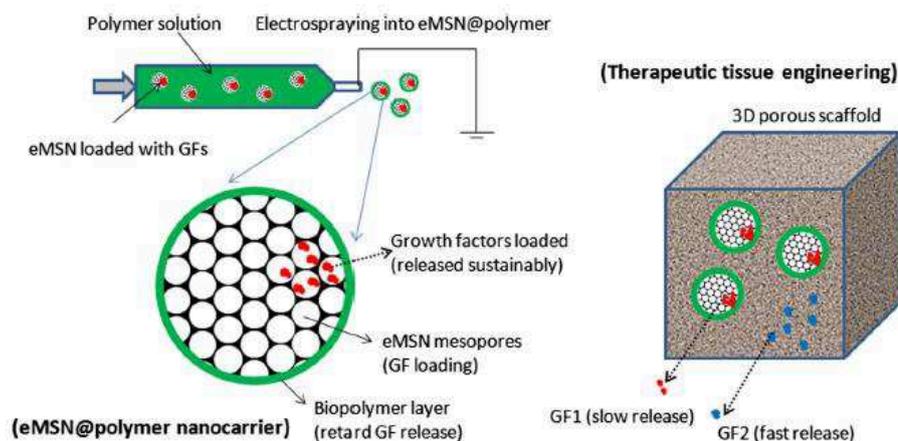


Figura 14: Representação esquemática da formação das NPP em estudo para a libertação controlada de fatores de crescimento e subsequente combinação com *scaffolds* de colagénio, de forma a utilizar o sistema de veiculação para a cultura de células e engenharia tecidual (Kim et al., 2014)

A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada neste estudo como modelo proteico, verificando-se a sua incorporação nas nanoesferas. O biopolímero aumentou consideravelmente o período de libertação da BSA (2-3 semanas a partir de nanoesferas revestidas comparativamente a uma semana a partir de nanoesferas sem biopolímero). Além disso, concluiu-se que a taxa de libertação foi influenciada pela composição do polímero, tendo-se registado uma maior libertação aquando da utilização de PEG comparativamente a PLA.

O *scaffold* de colagénio além de diminuir (ainda mais) a libertação da proteína, possibilitou também a incorporação de uma outra proteína, de libertação rápida, eficaz para uma veiculação sequencial de proteínas, como pode ser visto na figura 14.

Após se comprovar a libertação controlada de proteínas a partir do sistema de veiculação em causa, foi testada a eficácia terapêutica biológica do sistema recorrendo-se ao fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF). O aFGF tem a capacidade de induzir uma proliferação celular elevada e está igualmente envolvido na formação de

vasos sanguíneos. Verificou-se que este agente de contraste encapsulado em NPP e incorporado nos *scaffolds* foi libertado ao longo de um mês, a uma taxa controlada, apresentando um padrão de libertação idêntico ao da BSA.

A atividade biológica do aFGF foi também comprovada *in vitro* através da proliferação de células precursoras osteoblásticas nos *scaffolds*. Adicionalmente, os *scaffolds* incorporados com aFGF e implantados em tecido subcutâneo de ratos durante 2 semanas, revelaram uma invasão consideravelmente aumentada de fibroblastos.

Assim, conclui-se que a encapsulação de nanoesferas mesoporosas por biopolímeros prolonga, na realidade, a libertação de fatores de crescimento ao longo de semanas até um mês. Este sistema de veiculação de fatores de crescimento a longo prazo é benéfico pois permite doses contínuas, essenciais para a reparação dos tecidos e processos de regeneração. Além disso, o *scaffold* desenvolvido é uma possível matriz tridimensional terapêutica para cultura celular e engenharia de tecidos (Kim et al., 2014).

3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS

A veiculação de agentes terapêuticos especificamente para os locais de interesse é uma limitação no tratamento atual de diversas patologias. Habitualmente, após a administração de um fármaco, verifica-se uma eficácia reduzida, baixa biodistribuição, reações adversas indesejáveis e falta de seletividade do mesmo (Bhatia, 2016). Adicionalmente, grande parte dos fármacos possui pouca ou nenhuma solubilidade aquosa o que se traduz numa desvantagem, já que a solubilidade é um fator chave para determinar a eficácia do fármaco, qualquer que seja a sua via de administração (Patravale, Dandekar, & Jain, 2012). Porém, as limitações mencionadas podem ser ultrapassadas através de sistemas controlados de veiculação de fármacos. Com estes sistemas obtém-se um transporte dos fármacos para os locais alvo e, portanto, a sua ação nos tecidos saudáveis e os efeitos adversos inerentes podem ser consideravelmente reduzidos. Além disso, verifica-se a proteção dos mesmos de uma rápida degradação ou *clearance* e, por conseguinte, melhoria da sua concentração (e conseqüente acumulação) nos tecidos de interesse, resultando na necessidade de administração de doses mais baixas.

Neste âmbito, o rápido crescimento da nanotecnologia revelou que as NP são bastante promissoras como transportadoras de fármacos e tem vindo a ser notório o seu sucesso na melhoria das propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas das terapêuticas convencionais. Em parte devido aos seus reduzidos tamanhos, as NP têm características físico-químicas e biológicas ímpares (como por exemplo a capacidade de atravessarem barreiras celulares e tecidulares, nas quais se inclui a BHE) que as tornam proveitosas para aplicações médicas. Além disso, a versatilidade que lhes está associada permite a sua administração pelas vias comuns como a via oral, parentérica e tópica (Bhatia, 2016; Patravale et al., 2012; Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012).

De forma a atingirem o local de interesse, os fármacos podem ser veiculados de forma ativa ou passiva. A veiculação ativa pressupõe a conjugação de ligandos, à superfície das NP, com elevada afinidade e especificidade para recetores localizados à superfície das células alvo. Este tipo de veiculação pode também ser conseguida através de interações antigénio-anticorpo ou recorrendo a aptâmeros. Por outro lado, a veiculação passiva tem por base alterações fisiológicas dos tecidos alvo face aos tecidos normais

(Parveen et al., 2012). Este tipo de veiculação está associada ao efeito EPR (*enhanced permeability and retention*), característico dos tecidos tumorais e de locais de inflamação e infecção (Bamrungsap et al., 2012; Parveen et al., 2012), que será abordado mais à frente. Após os conjugados fármaco-NP atingirem os locais alvo, uma libertação controlada dos compostos terapêuticos pode ser conseguida através de alterações a nível da temperatura ou pH ou, até mesmo, através de atividade enzimática (Wilczewska et al., 2012).

Dentro da área da nanotecnologia, as NPP são um dos nanotransportadores de fármacos com maior potencial e destaque, e baseiam-se na formulação dos compostos terapêuticos recorrendo a polímeros naturais ou sintéticos, tal como foi anteriormente referido (Capítulo 1). As propriedades físico-químicas, a morfologia e o tamanho do polímero influenciam a eficácia das NPP sobretudo no que diz respeito à encapsulação ou incorporação de fármacos, bem como à libertação dos mesmos. Estas características inerentes ao polímero são também fulcrais na determinação da sua biocompatibilidade.

Os sistemas de veiculação de fármacos baseados em NPP têm vindo a ser aplicados em diversas áreas da medicina, essencialmente naquelas em que não se obtiveram os resultados pretendidos com as terapêuticas convencionais, ou em que estes sistemas de veiculação apresentaram benefícios consideráveis face às mesmas. Adicionalmente, também tem vindo a ser explorada a sua utilização em diversas terapêuticas biológicas, tais como a terapia génica, RNA de interferência, vacinação e terapia celular. De seguida serão abordadas algumas dessas áreas de utilização, onde o sucesso das NPP como sistemas de veiculação de fármacos é notório (Patravale et al., 2012).

3.1. Anticancerígenos

O cancro constitui a segunda principal causa de morte a nível mundial e, só em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram com esta patologia. Adicionalmente, estima-se que nos próximos 20 anos o número de novos casos aumente cerca de 70%. Dos vários tipos de cancro existentes o do pulmão é o mais mortal, seguindo-se o do fígado, colo-retal, estômago e mama (World Health Organization, 2017).

Atualmente existem quatro opções terapêuticas principais para o cancro: quimioterapia, cirurgia, radioterapia e imunoterapia. A quimioterapia é uma das estratégias mais utilizadas mas os fármacos convencionais têm algumas limitações

associadas. Destas limitações pode destacar-se a elevada toxicidade que lhes está associada, a biodisponibilidade oral reduzida, a insolubilidade aquosa, os índices terapêuticos baixos e a biodistribuição inespecífica, levando a que o fármaco afete não só as células cancerígenas, como também as células normais. Por esta razão, é crucial a descoberta e desenvolvimento de novos tratamentos que aliem simultaneamente uma maior eficácia e menor toxicidade (Masood, 2016).

Existem variados sistemas baseados em NP atualmente utilizados na terapêutica do cancro. Mais especificamente, os sistemas direcionados de veiculação de fármacos baseados em NPP apresentam-se como uma estratégia promissora para o tratamento desta patologia. Regra geral, as NPP são constituídas por um núcleo hidrofóbico que, neste caso, inclui o agente anticancerígeno e por uma superfície hidrofílica que possibilita a estabilização destas estruturas em meio aquoso. O agente anticancerígeno pretendido pode ser adsorvido, encapsulado ou, até mesmo, conjugado não só no interior das NPP, como também à sua superfície, havendo posteriormente uma libertação controlada do mesmo no local de interesse. Na figura 15 pode observar-se uma representação esquemática da estrutura deste sistema de veiculação de fármacos anticancerígenos baseado em NPP (Barreto et al., 2011; Masood, 2016; Prabhu, Patravale, & Joshi, 2015).

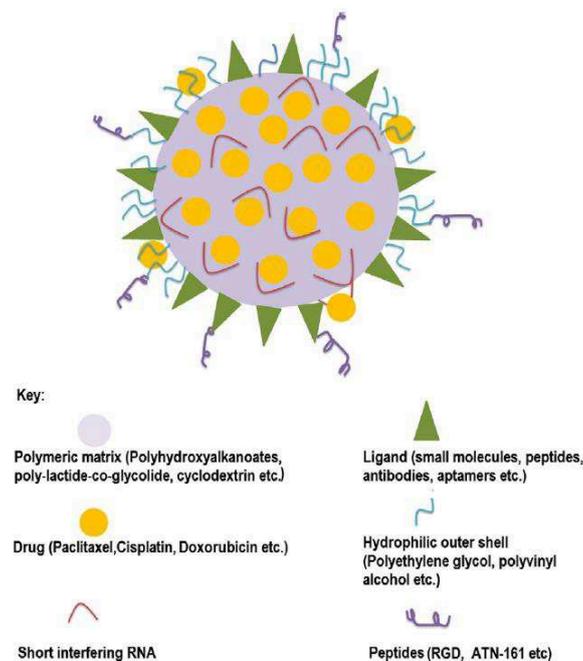


Figura 15: Representação esquemática da estrutura de um sistema de veiculação de fármacos baseado em NPP (Masood, 2016)

Atualmente, grande parte dos sistemas de veiculação de fármacos utilizados para o tratamento do cancro tem por base o efeito EPR. Este efeito relaciona-se com a maior permeabilidade dos vasos sanguíneos tumorais às NP comparativamente com os vasos sanguíneos normais, e com a reduzida *clearance* destas NP do espaço intersticial do tumor (possibilitando uma maior retenção das mesmas). Devido ao efeito EPR a acumulação das NP no tumor é entre cinco a dez vezes superior em comparação com a acumulação verificada nos tecidos normais. Esta estratégia é utilizada na veiculação passiva de fármacos, tal como foi referido anteriormente, e na figura 16 pode observar-se este efeito, por comparação entre tecidos normais e tumorais (Barreto et al., 2011).

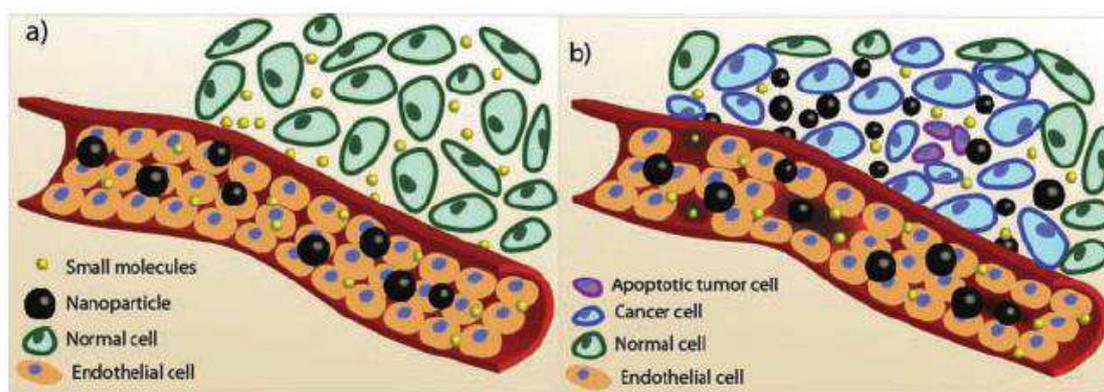


Figura 16: Representação do efeito EPR. Nos tecidos normais, apenas pequenas moléculas difundem através dos vasos sanguíneos (a) contudo, nos tumores, também as NP conseguem difundir-se para os tecidos (b) (Barreto et al., 2011)

Em adição aos benefícios supramencionados, é importante realçar ainda que idealmente estes sistemas de NPP possuem algumas propriedades fundamentais, tais como uma adequada biodegradabilidade e biocompatibilidade, uma circulação prolongada e toxicidade nula, tornando-os bastante vantajosos nesta área (Masood, 2016).

Os progressos, na área da veiculação de fármacos anticancerígenos utilizando NPP, têm sido evidentes. Neste âmbito, e por forma a ampliar as estratégias terapêuticas do cancro do ovário, Cheng, Jin, Lv, Ding e Han (2011) desenvolveram e sintetizaram NP formuladas a partir de copolímeros de PLGA-mPEG e constituídas por um núcleo de cisplatina ligada a carboximetilcelulose. Apesar da cisplatina ser um fármaco bastante potente, o seu uso é limitado devido aos efeitos adversos graves e às características físico-

químicas desfavoráveis que lhe estão associadas. Por essa razão, a finalidade primordial é que as NPP em estudo possuam uma elevada eficiência de encapsulação e possibilitem uma liberação controlada de cisplatina, além de reduzirem a sua toxicidade.

As NPP sintetizadas apresentaram um diâmetro médio de cerca de 180-210 nm e a eficiência de encapsulação da cisplatina foi de até 71%. Adicionalmente, foi observada uma liberação controlada do fármaco durante 5 dias a partir das NPP, tal como se pode observar na figura 17.

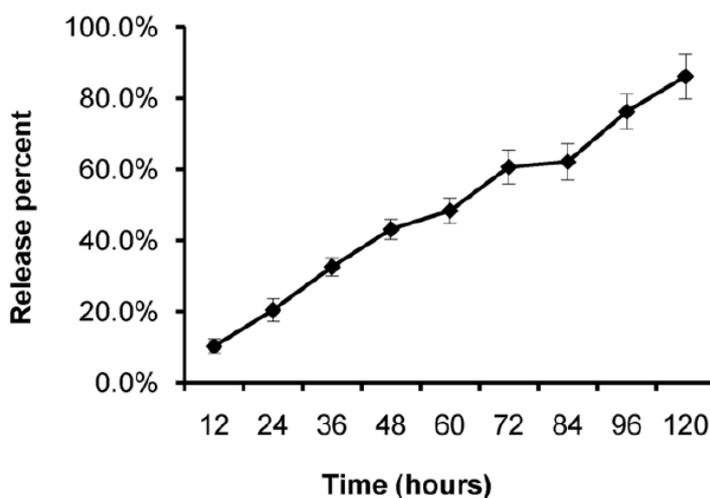


Figura 17: Perfil de liberação da cisplatina a partir das NPP (Cheng et al., 2011)

Através da análise *in vitro* da viabilidade celular e respetiva eficácia do tratamento, foi possível concluir que a viabilidade das células IGROV1-CP (células cancerígenas do ovário) expostas durante 3 dias a cisplatina livre, em concentrações que variaram entre 8 e 24 μM , revelou uma diminuição de 79,6% para 14,8%. Por outro lado, e nas mesmas condições, a viabilidade celular com as NPP de cisplatina diminuiu de 76,9% para 10,8%. Na figura 18 é possível comparar as taxas de inibição do crescimento celular, tendo em conta as concentrações de fármaco/NPP administradas. Não se verificaram diferenças significativas entre os dois tratamentos nas concentrações testadas, concluindo-se igualmente que a citotoxicidade da cisplatina livre e encapsulada em NPP foi dependente da dose.

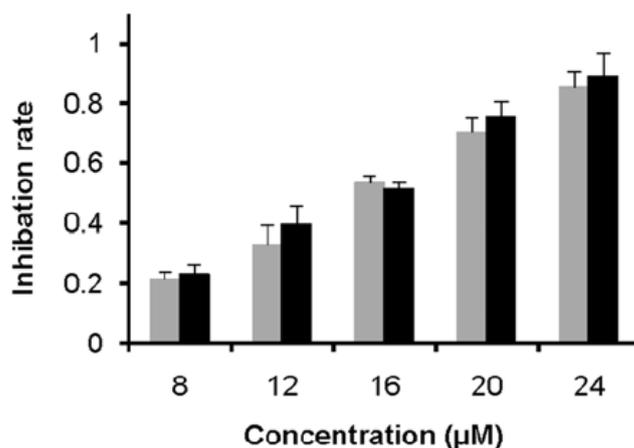


Figura 18: Inibição do crescimento das células IGROV1-CP quando expostas à cisplatina livre (barras cinzentas) e às NPP (barras pretas) durante 3 dias (Cheng et al., 2011)

Foi também possível verificar que as NPP sintetizadas demonstraram eficácia ao inibirem o crescimento tumoral em ratinhos comparativamente com a mesma dose de cisplatina livre, o que indica que as mesmas não limitam a atividade anticancerígena *in vivo* do fármaco. No que diz respeito à dose letal média (DL_{50}), as NPP de cisplatina e a cisplatina livre obtiveram um valor de cerca de 103 mg/kg e 8 mg/kg, respetivamente, após administração intravenosa. Deste modo, é possível afirmar que as NPP têm um melhor perfil de segurança quando comparadas com a cisplatina livre.

No geral, as NPP em estudo revelaram ser bastante promissoras para a veiculação de cisplatina, o que se traduz numa estratégia terapêutica efetiva para o cancro do ovário já que a cisplatina é considerada um dos tratamentos de 1ª linha nesta patologia. O facto de não se terem registado efeitos adversos graves ou toxicidade cumulativa contribui, ainda mais, para o sucesso destas NPP. Contudo, de forma a aumentar a ação antitumoral das NPP, é ainda necessário otimizar a dosagem das mesmas (Cheng et al., 2011).

Ainda no âmbito da terapêutica anticancerígena, Nair, Jagadeeshan, Nair e Kumar (2011) desenvolveram e avaliaram a eficácia antitumoral de NP de PLGA encapsuladas com 5-fluorouracilo (5-FU), um análogo da pirimidina com amplo espetro de ação.

Uma vez que o PLGA é um polímero resultante da combinação de ácido láctico e ácido glicólico foram sintetizadas, por dupla emulsificação, e posteriormente avaliadas NP de PLGA com duas combinações diferentes destes monómeros, nas proporções 50-50 e 90-10 (láctico/glicólico). Ao regular-se a proporção de cada monómero, a taxa de degradação do polímero pode também ser controlada. Posteriormente, foi estudada a ação

biológica destas NPP em linhas celulares de adenocarcinoma da mama (MCF7) e glioblastoma (U87MG), visto que o 5-FU é considerado um tratamento efetivo para cânceros da mama e do cérebro.

As NPP de PLGA 50-50 encapsuladas com 5-FU apresentaram um tamanho médio de 150 nm e uma eficiência de encapsulação de 66%. No que diz respeito às NPP de PLGA 90-10, o seu tamanho médio foi de 190 nm e a eficiência de encapsulação revelou ser semelhante à das primeiras.

Um dos objetivos deste estudo passava por compreender os efeitos que a variação no ratio ácido láctico/glicólico teria na libertação de 5-FU, a partir das NPP em análise. Deste modo, foram efetuados estudos de libertação *in vitro*, através dos quais foi possível concluir que as duas combinações de PLGA permitem uma libertação controlada de 5-FU durante 1 semana contudo, com as NPP de PLGA 50-50 a libertação do fármaco dá-se mais rapidamente, como se pode ver na figura 19. Ao fim de 1 semana, a percentagem de 5-FU libertado foi de 85% para as NPP de PLGA 50-50 e 65% para as NPP de PLGA 90-10. Esta diferença de valores ocorre uma vez que as NPP com a combinação 50-50 têm uma maior quantidade de ácido poliglicólico, que é hidrofílico, ao contrário das NPP 90-10 que têm uma maior quantidade de ácido polilático, que é hidrofóbico. Desta forma, as NP 50-50 possuem uma degradação mais rápida, o que também se traduz numa libertação mais rápida de 5-FU.

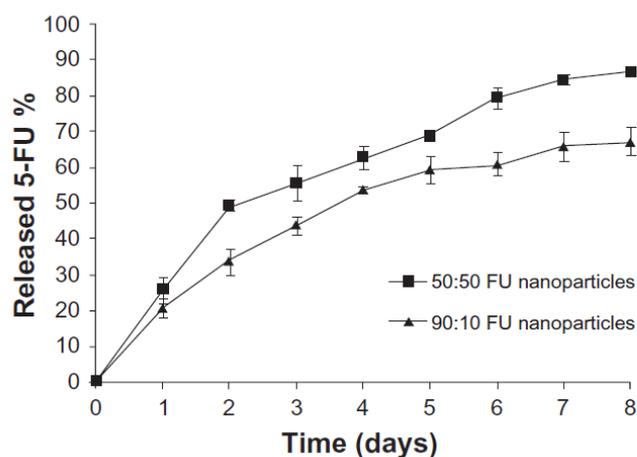


Figura 19: Perfil de libertação *in vitro* de 5-FU a partir de NP de PLGA 50-50 e 90-10 (Nair K, et al., 2011)

No que diz respeito à absorção celular das NPP pelas linhas celulares MCF7 e U87MG, verificou-se uma internalização eficiente 2 horas após incubação, independentemente do ratio ácido láctico/glicólico utilizado. Através de estudos de viabilidade celular foi possível concluir que as NPP inibiram o crescimento celular, de forma dependente da dose e do tempo de exposição, em ambas as linhas celulares. Observou-se igualmente que as NP de PLGA 50-50 possuem uma citotoxicidade superior quando comparadas com 5-FU livre, no que concerne às linhas celulares tumorais referidas anteriormente. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o tratamento com NP de PLGA 50-50 possui uma eficácia antitumoral superior em comparação com NP de PLGA 90-10 e 5-FU livre, já que também foi verificada indução da apoptose num maior número de células U87MG e MCF7 com estas NPP.

Deste modo, é possível concluir que, comparativamente com 5-FU livre, as NPP de PLGA encapsuladas com o fármaco são uma estratégia bastante promissora e benéfica para futuros tratamentos quimioterapêuticos (Nair K et al., 2011).

As últimas décadas ficaram marcadas pelo notável progresso nas áreas do diagnóstico, prevenção e tratamento do cancro. Todavia, apesar dos esforços para combater esta patologia, a mesma continua a representar uma ameaça global. A nanotecnologia e, em particular, as NPP têm demonstrado o seu enorme potencial e sucesso quando aplicadas no tratamento do cancro, através de sistemas direcionados de veiculação de fármacos que permitem superar as limitações das terapêuticas atuais, tal como referido anteriormente (Biemar & Foti, 2013). O Abraxane®, também denominado nab-paclitaxel, é uma NPP de albumina formulada com paclitaxel, já disponível no mercado, e constitui uma prova do sucesso da aplicação das NPP na veiculação de anticancerígenos (Desai, 2012).

3.2. Doenças Neurodegenerativas

Com o aumento da esperança média de vida a nível mundial, verificou-se também um aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson, o que resultou num elevado impacto social e económico (Saraiva et al., 2016).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas, tal como o nome indica, por uma gradual degeneração e destruição das células nervosas. Esta destruição celular pode

ter repercussões a nível do movimento (ataxia) ou das capacidades cognitivas (demência), afetando claramente a qualidade de vida dos doentes.

Atualmente, as terapêuticas disponíveis apenas possibilitam o tratamento dos sintomas, não interferindo na progressão da doença (Goldsmith, Abramovitz, & Peer, 2014). Contudo, e apesar da intensa procura de terapêuticas mais eficazes para estas patologias que afetam o sistema nervoso central (SNC), a incapacidade dos fármacos atravessarem a BHE, de forma correta, continua a ser uma limitação (Patel, Zhou, Piepmeier, & Saltzman, 2012).

As barreiras do SNC desempenham um papel crucial na separação entre o mesmo e a periferia. De todas elas, a BHE, constituída por células endoteliais, é a mais seletiva (Saraiva et al., 2016). A BHE tem como função limitar o movimento de substâncias (principalmente moléculas de grandes dimensões como péptidos ou proteínas) entre a circulação e o SNC contribuindo, assim, para o controlo do microambiente cerebral. A sua enorme seletividade resulta em que apenas menos de 1% de um fármaco administrado por via intravenosa alcance o SNC. Deste modo, para serem obtidos níveis terapêuticos adequados no cérebro, são necessárias elevadas doses de fármacos, o que poderá causar sérios efeitos adversos. Posto isto, é fundamental encontrar tratamentos que possam travar a progressão destas doenças, os quais terão, por conseguinte, resultados muito mais positivos na qualidade de vida e sobrevivência dos doentes (Goldsmith et al., 2014; Patel et al., 2012).

Várias estratégias, nas quais se incluem a utilização de NP e a administração por via intranasal, têm vindo a destacar-se e a ser investigadas com o intuito de superar os atuais desafios da veiculação de fármacos para o SNC (Fonseca-Santos, Gremiao, & Chorilli, 2015; Goldsmith et al., 2014).

A administração por via intranasal apresenta-se como uma estratégia não invasiva para a veiculação cerebral de fármacos já que, desta forma, há a possibilidade de ultrapassar a BHE, veiculando os fármacos diretamente para o SNC. Já as NP revelam ser sistemas de veiculação de fármacos bastante promissores e versáteis para regiões de difícil acesso, como é o caso do cérebro. Além de terem a capacidade de proteger os fármacos, possibilitam também a sua eficiente veiculação para os locais pretendidos, isto é, lesionados. Várias formulações baseadas em NP foram já administradas em animais saudáveis, revelando a sua capacidade em transpor a BHE, sobretudo quando alteradas com tensioativos ou ligandos. Tal como se pode observar pela figura 20, existem vários mecanismos que possibilitam a passagem das NP pela BHE, nomeadamente a via

paracelular, difusão transcelular, transcitose e endocitose mediada por recetor (Fonseca-Santos et al., 2015; Saraiva et al., 2016).

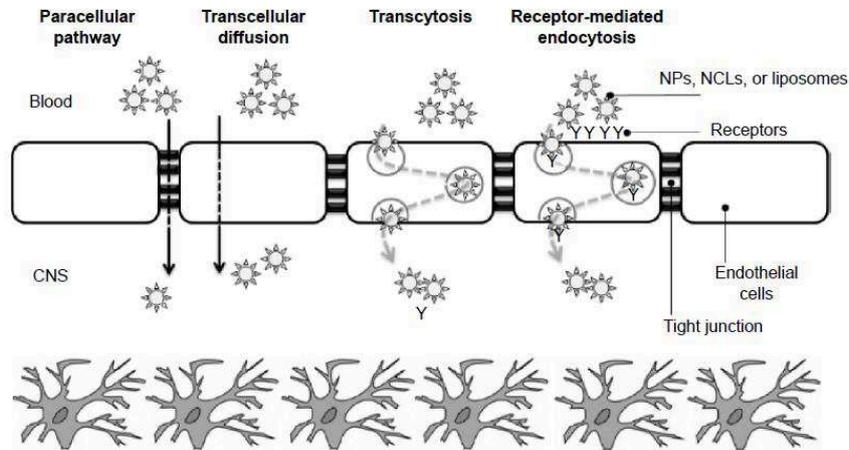


Figura 20: Principais vias de passagem das NP através da BHE (Fonseca-Santos et al., 2015)

As NPP, em particular, constituem uma potencial solução para as limitações supramencionadas. A intensa investigação nas últimas décadas comprova que as NPP podem ser utilizadas para uma veiculação terapêutica efetiva para o SNC e, adicionalmente, grande parte dos polímeros utilizados na sua preparação são biodegradáveis e biocompatíveis, o que amplia a relevância clínica deste tipo de NP (Patel et al., 2012).

Prova disso é o estudo realizado por Zhang et al. (2014) no qual foi desenvolvido um sistema de veiculação de fármacos com dupla funcionalidade baseado em NP de PEG-PLA, como potencial tratamento para o Alzheimer.

De forma a ultrapassar o primeiro grande obstáculo no tratamento do Alzheimer, ou seja, a BHE, os autores recorreram a um ligando constituído por 12 aminoácidos, TGNYKALHPHNG (de forma abreviada, TGN). Através de estudos realizados anteriormente, sabe-se que as NP modificadas com este ligando sofrem uma acumulação no cérebro 3,6 vezes superior comparativamente com as NP não alteradas. Deste modo, o TGN foi utilizado como ligando preferencial para o direcionamento e posterior passagem através da BHE.

Posteriormente, é fundamental saber a localização das lesões cerebrais do Alzheimer de forma a conseguir-se um eficiente direcionamento das NPP. O Alzheimer

é caracterizado por uma agregação extracelular de placas amilóides. Estas placas formam-se devido a um aumento na produção, acumulação e subsequente agregação do péptido amilóide- β ($A\beta$), sendo o $A\beta_{1-42}$ a espécie mais comum deste péptido. Embora não se compreenda totalmente o mecanismo de progressão desta patologia, o $A\beta_{1-42}$ constitui um alvo interessante para a terapêutica do Alzheimer. Posto isto, um péptido D-enantiomérico, QSHYRHISPAQV (de forma abreviada, QSH), foi utilizado como ligando para o direcionamento das NPP, tendo como alvo o péptido $A\beta_{1-42}$.

Estas NPP modificadas com o TGN conseguiram, na prática, uma maior absorção celular e distribuição cerebral quando comparadas às NPP não modificadas com o ligando em questão. Além disso, devido ao QSH, verificou-se uma veiculação precisa e direcionada para as placas amilóides no cérebro de ratinhos. A segurança deste sistema foi também confirmada, verificando-se que as NPP apresentaram uma baixa citotoxicidade.

Já que a produção e a acumulação do péptido $A\beta$ são mecanismos fundamentais para a doença de Alzheimer, as NPP em análise constituem um promissor sistema de veiculação, tanto para o diagnóstico precoce, como também para a terapêutica desta doença tão preocupante na atualidade (Zhang et al., 2014).

Também na área do tratamento do Parkinson têm sido notórios os progressos efetuados recorrendo às NPP. Trapani et al. (2011) desenvolveram NP de quitosano (CS) e avaliaram a sua capacidade para atravessar a BHE, com o intuito de obterem uma veiculação cerebral de dopamina (DA), através de administração parentérica. As NPP de CS foram incubadas com o neurotransmissor a duas concentrações distintas (1 e 5 mg/ml) originando NPP designadas como DA/NPCS (1) e DA/NPCS (5), respetivamente.

Posteriormente, as NPP de DA foram caracterizadas *in vitro* no que respeita às suas características físico-químicas, à capacidade de veicularem e libertarem o fármaco e ao transporte através da linha celular MDCKII-MDR1, usada como modelo *in vitro* representativo da BHE.

Após a confirmação de que a DA foi adsorvida na superfície externa das NPP, analisou-se a libertação *in vitro* das mesmas. Tal como se pode concluir através da figura 21, as DA/NPCS (5) demonstraram uma considerável libertação inicial de DA, à qual se segue uma cinética de libertação decrescente durante cerca de 48 h. Em contraste, com as DA/NPCS (1) verificou-se uma menor libertação do fármaco, tendo estas NPP um perfil de libertação praticamente constante. Deste modo, pensa-se que as DA/NPCS (5) são as

mais indicadas para a veiculação cerebral de DA, pois permitem uma libertação cerebral do neurotransmissor rápida e pulsátil.

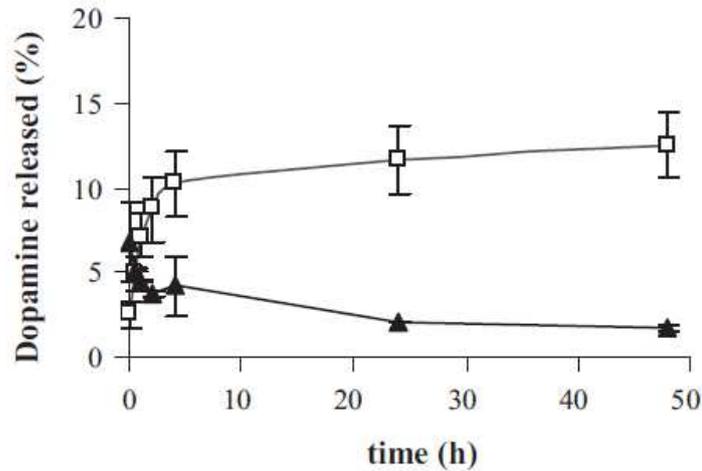


Figura 21: Perfis de libertação *in vitro* relativos a DA/NPCS (5) (□) e DA/NPCS (1) (▲) (Trapani et al., 2011)

No que diz respeito à citotoxicidade, as NPP, em ambas as concentrações de DA, revelaram ser menos tóxicas comparativamente com a dopamina isolada, após 3 h de incubação.

Em adição, os estudos relativos ao transporte através da linha celular MDCKII-MDR1 indicaram que as DA/NPCS (5) possibilitam um significativo aumento do transporte em comparação com o controlo e com as DA/NPCS (1).

De modo a avaliar o efeito neurotóxico das NPCS e das DA/NPCS, foi também realizada uma análise da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio, a qual revelou uma baixa neurotoxicidade das DA/NPCS, após 3 h.

Por último, os autores realizaram experiências de microdiálise cerebral *in vivo* em ratos, para avaliar se a administração de DA/NPCS (5) afeta a transmissão dopaminérgica cerebral. Concluiu-se, através deste procedimento, que a administração intraperitoneal de DA/NPCS (5) (6-12 mg/kg) induziu um aumento, dependente da dose, dos níveis de DA estriatal.

Deste modo, a partir de todos os resultados obtidos e apresentados, é possível concluir que sobretudo as DA/NPCS (5) representam um interessante e promissor sistema

de veiculação cerebral de DA e, portanto, podem ser muito úteis para o tratamento da doença de Parkinson no futuro (Trapani et al., 2011).

3.3. Anti-infecciosos

As doenças infecciosas são um dos grandes desafios na área da saúde uma vez que podem ter um enorme impacto sobre a população. As infecções têm várias particularidades que, quando ponderadas em conjunto, permitem diferenciá-las de outras doenças. A imprevisibilidade que lhes está associada e a capacidade de gerarem um efeito explosivo a nível global são apenas dois dos exemplos possíveis dessas mesmas particularidades (Fauci & Morens, 2012).

As infecções bacterianas representam uma das áreas mais desafiantes à escala global apesar do elevado sucesso associado ao uso de antibióticos no tratamento destas infecções. Determinadas infecções bacterianas, nas quais se inclui a tuberculose, são bastante difíceis de erradicar devido, entre outros aspetos, ao facto de existirem diversas barreiras que limitam o acesso dos antibióticos aos locais de infeção. Adicionalmente, a resistência aos antibióticos tem vindo a crescer de forma preocupante. Esta resistência é ainda agravada pela diminuição do desenvolvimento de antibióticos por parte do setor farmacêutico. Todos estes fatores aliados remetem para a grande necessidade de desenvolver novas estratégias efetivas para o combate a estas infecções. A nanotecnologia e, em particular, as NPP podem ser uma dessas estratégias na medida em que têm a capacidade de melhorar a farmacocinética e a eficácia dos fármacos, o que é vantajoso face à administração dos mesmos na sua forma livre (Gao, Thamphiwatana, Angsantikul, & Zhang, 2014).

Vários estudos têm sido realizados na área das infecções bacterianas, dos quais se pode destacar o realizado por Toti et al. (2011) no qual foram utilizadas NPP de PLGA para uma veiculação de antibióticos a infecções intracelulares por *Chlamydia*.

A *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae* são bactérias intracelulares obrigatórias às quais estão associadas várias doenças crónicas, sendo que as infecções persistentes causadas por ambos os microrganismos são resistentes à terapêutica antibiótica. Uma vez que estes microrganismos residem em inclusões citoplasmáticas nas células do hospedeiro, a reduzida eficácia terapêutica deve-se, entre outros fatores, às limitadas concentrações intracelulares de fármaco obtidas nestas inclusões através da

veiculação habitual de antibióticos. Contudo, a eficácia terapêutica pode ser melhorada através de métodos que interfiram com a penetração dos antibióticos nas mesmas.

Deste modo, os autores analisaram a possibilidade das NP de PLGA poderem melhorar a veiculação antibiótica aos complexos de inclusão da bactéria. Inicialmente, analisou-se o tráfego das NPP para as células infectadas com *Chlamydia trachomatis*. Posteriormente, avaliou-se as NPP como sistemas de veiculação de antibióticos (rifampicina e azitromicina) para as inclusões bacterianas.

As NP de PLGA foram marcadas com 6-cumarina e apresentaram um tamanho médio de cerca de 260 nm, tamanho este semelhante ao obtido pelas NPP encapsuladas com ambos os antibióticos. A taxa de libertação dos antibióticos a partir das NPP foi estudada *in vitro* e pode ser visualizada na figura 22. A azitromicina exibiu uma rápida libertação, com aproximadamente 80% do fármaco libertado em 24h, enquanto que com a rifampicina a libertação estendeu-se durante cerca de 7 dias. Já as NPP encapsulando os dois antibióticos em simultâneo revelaram uma libertação bastante mais lenta e controlada dos mesmos.

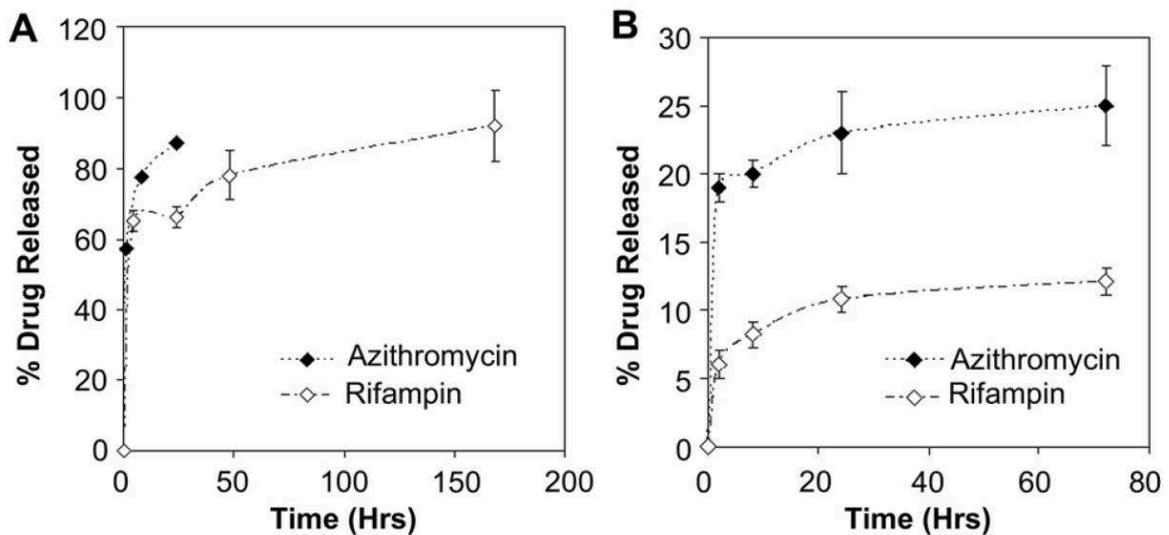


Figura 22: Libertação *in vitro* de rifampicina e azitromicina a partir de (A) NPP encapsuladas com cada um dos antibióticos em separado e (B) NPP encapsuladas com os dois antibióticos em simultâneo (Toti et al., 2011).

Através da análise do tráfego intracelular, foi possível concluir que as NPP se concentraram rápida e eficientemente nas inclusões de células HEp-2 infectadas (tanto

para células infetadas de forma aguda como persistente) o que revela a potencialidade deste tipo de NP para a veiculação de antibióticos para as inclusões de *Chlamydia*.

Em seguida, comparou-se a eficácia do tratamento entre os fármacos livres e as NPP encapsuladas, 0, 24 ou 48 h após a infecção das células com *Chlamydia trachomatis*. Chegou-se à conclusão que a encapsulação dos fármacos em NPP aumentou a eficácia dos mesmos na diminuição da carga microbiana. Adicionalmente, a encapsulação simultânea de ambos em NPP foi mais eficaz comparativamente com a combinação dos fármacos sem estarem encapsulados.

No geral, é possível concluir que o aumento da acumulação intracelular, e mais especificamente intra-inclusão, aliada a uma libertação controlada dos antibióticos melhora a eficácia dos mesmos quando encapsulados em NPP. Apesar de ser ainda necessário otimizar a eficiência da encapsulação dos fármacos, este estudo demonstrou a potencialidade das NP de PLGA como transportadores para a veiculação de antibióticos em casos de infecções por *Chlamydia* (Toti et al., 2011).

As infecções virais são outra área problemática, não só pela enorme quantidade de pessoas que afetam mundialmente, mas também pelo grande impacto socioeconómico que provocam. O tratamento eficaz destas infecções é complexo, devido sobretudo à progressiva resistência aos medicamentos, em particular aos que se relacionam com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e influenza. Por conseguinte, surgem graves problemas de saúde pública dos quais fazem parte o aumento da mortalidade e morbilidade, custos adicionais relacionados com a utilização de fármacos mais dispendiosos e, como resultado, maiores encargos para os sistemas de saúde públicos. Face a esta problemática é impreterível a descoberta e desenvolvimento de novas estratégias relacionadas com a terapêutica das infecções virais. Neste contexto, a nanotecnologia tem vindo a conquistar uma posição de destaque no tratamento de infecções virais comuns e as NPP, em particular, têm revelado um grande sucesso nesta área (Singh, Kruger, Maguire, Govender & Parboosing, 2017)

O estudo desenvolvido por Shibata et al. (2013) no qual foram estudadas NP de PLGA encapsuladas com uma associação de fármacos antirretrovirais, comprova o sucesso da aplicação das NPP nesta área. Este estudo tinha como objetivo o desenvolvimento de NPP biodegradáveis formuladas com uma associação de efavirenz (EFV) e lopinavir potenciado com ritonavir (LPV/r) como uma nova estratégia para o tratamento do HIV tipo I. É importante salientar que as NPP em questão já tinham demonstrado anteriormente a capacidade de libertação controlada de terapêutica

antirretroviral *in vivo*, durante 28 dias, o que confirma à partida o potencial das mesmas no tratamento do HIV.

As NP de PLGA encapsuladas com a combinação dos fármacos apresentaram um tamanho médio de aproximadamente $138,3 \pm 55,4$ nm e a eficiência de encapsulação foi superior a 79% para os 3 antirretrovirais.

A citotoxicidade das NPP contendo EFV e LPV/r foi determinada através de estudos de viabilidade celular com células não imunes (HeLa) e imunes (H9 e U937). Esta análise permitiu concluir que não houve, em nenhuma linha celular, uma significativa diminuição da viabilidade celular após o tratamento ao longo de 28 dias com as NPP em questão. Os resultados obtidos sugerem que as NPP de PLGA encapsuladas não possuem citotoxicidade significativa, uma vez comparadas *in vitro* com células não tratadas ou tratadas com NPP sem fármacos encapsulados.

A absorção das NPP contendo EFV e LPV/r por parte de células T humanas (H9) e fibroblastos (HeLa) foi também avaliada a partir da fluorescência das mesmas (após marcação com lissamina e rodamina), sendo notória uma eficiente absorção das NPP nestas células. Em adição, a concentração intracelular e a localização específicas dos antirretrovirais absorvidos por células H9 infetadas com HIV-1 foram igualmente estudadas utilizando o fracionamento subcelular. As células infetadas foram sujeitas a tratamento com soluções dos fármacos antirretrovirais ou com NPP contendo a associação dos fármacos, durante 7 dias. Observou-se que as células tratadas com as NPP possuíam níveis superiores dos 3 antirretrovirais (a nível nuclear, do citoesqueleto e membranas) em comparação com as células tratadas com os fármacos isolados, tal como se observa na figura 23.

Por fim, os autores avaliaram também a eficácia antirretroviral das NPP encapsuladas com a associação de fármacos, tendo as mesmas demonstrado o seu potencial para inibir eficientemente a infeção das células T pelo HIV-1 e a transdução (Shibata et al., 2013).

Tendo em mente que o HIV continua a ser uma das doenças infecciosas mais impactantes mundialmente e que no fim do ano de 2016, aproximadamente 36,7 milhões de pessoas estavam infetadas com este vírus, a investigação de novas estratégias terapêuticas nesta área não pode ser esquecida (WHO, 2017). Os resultados supramencionados revelam a eficácia e a potencialidade das NP de PLGA para a veiculação de terapêuticas antirretrovirais combinadas, com o intuito de inibir a replicação do HIV-1 limitando, assim, a infecciosidade deste mesmo vírus e constituindo

uma estratégia bastante interessante para futuras opções terapêuticas (Shibata et al., 2013).

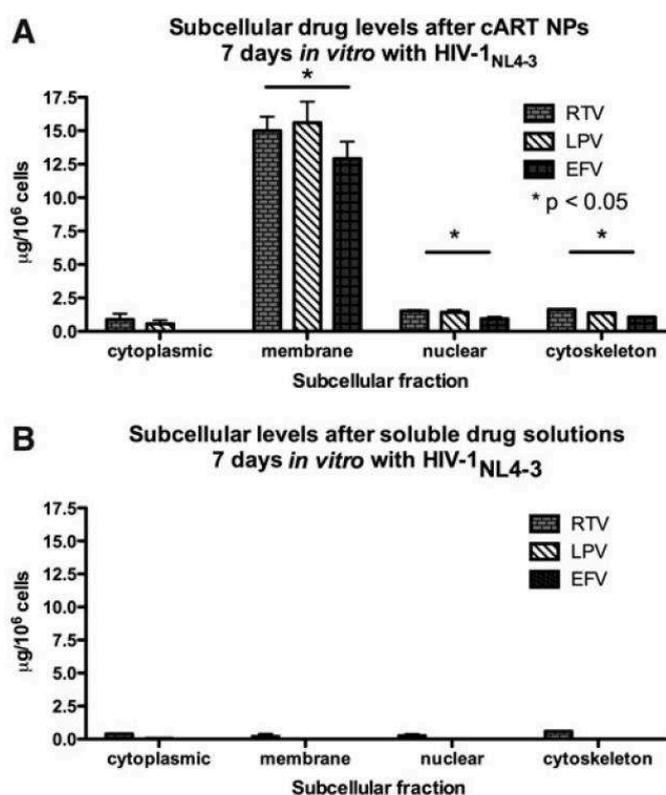


Figura 23: Comparação entre os níveis do tratamento antirretroviral nos compartimentos subcelulares de células H9 em cultura com NPP contendo a associação de fármacos (A) ou com os fármacos isolados (B) depois de 7 dias de incubação com HIV-1_{NL4-3} (Shibata et al., 2013)

É importante reforçar ainda que, à parte do HIV, as NPP têm demonstrado a sua potencialidade no tratamento de outras infecções virais. O estudo realizado por Wang, Feng, Wang e Chen (2010), no qual foram avaliadas NP catiónicas de copolímeros biodegradáveis como sistemas de veiculação de *small interfering* RNA (siRNA) confirma a eficácia e o potencial das mesmas como opção terapêutica da Hepatite B. Por sua vez o estudo realizado por Steinbach, Weller, Booth e Saltzman (2012) demonstra a eficácia da administração intravaginal de NP de PLGA encapsuladas com siRNA no tratamento de infecções genitais por vírus *Herpes simplex* tipo 2 em ratinhos (Steinbach et al., 2012; Wang et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

As NPP possuem várias vantagens que se devem, em grande parte, às suas reduzidas dimensões, o que possibilita a veiculação das substâncias para os locais pretendidos e a sua subsequente acumulação nos mesmos. Além da eficácia, segurança e biocompatibilidade que as caracteriza, as NPP são igualmente dotadas de uma grande versatilidade e, portanto, com um enorme potencial para aplicações médicas. Os benefícios da sua utilização são evidentes, em áreas que variam desde a imagiologia à veiculação de fármacos, passando também pelos pró-fármacos, *nanothranostics* e engenharia de tecidos/regeneração, tal como foi discutido ao longo deste trabalho.

Na imagiologia, mais concretamente na TAC e RM, duas das principais técnicas imagiológicas da atualidade, as NPP revelaram a sua capacidade para a veiculação de agentes de contraste, ultrapassando as limitações a estes associadas e que se repercutem em ambas as técnicas. Ao facilitarem a veiculação de grandes concentrações de agentes de contraste para os locais alvos, possibilitam maiores janelas temporais para realizar as técnicas, ou seja, maiores períodos de obtenção de informação, aliados a um bom perfil de segurança. Deste modo, há um melhor contraste, o que se traduz em imagens clinicamente úteis e, conseqüentemente, diagnósticos mais acertados, recorrendo a menores doses destes agentes.

No que respeita aos pró-fármacos, foram também confirmadas as vantagens da aplicação das NPP nesta área. No presente, os pró-fármacos constituem uma estratégia poderosa para melhorar as propriedades de moléculas ativas, especialmente na área oncológica. A sua encapsulação em NPP revelou ser bastante promissora, tal como foi relatado no estudo realizado por Dhar et al. (2008). Neste estudo foi provada a eficácia das NPP formuladas com um pró-fármaco de Pt(IV) no tratamento do cancro da próstata, revelando a superior citotoxicidade das mesmas para as células cancerígenas face à cisplatina livre.

Já os *nanothranostics*, estruturas multifuncionais com a capacidade de atuar, simultaneamente, a nível do diagnóstico e da terapêutica, constituem uma das áreas de aplicação das NPP com maior potencialidade. Apesar da complexidade que lhes está associada e de ainda estarem em fase de investigação e desenvolvimento, prevê-se que tenham um enorme impacto na prática clínica. Ao permitirem também uma prévia avaliação da resposta à terapêutica, os *nanothranostics* possibilitam a elaboração de protocolos terapêuticos individualizados que aliam uma eficácia superior e um perfil de

segurança favorável. Assim, a sua utilização nas mais diversas patologias é bastante aliciante e promissora, tal como foi demonstrado no estudo de Shalviri et al. (2013), no qual foram claramente evidenciados os benefícios das NPP na veiculação simultânea de um agente de contraste (Gd^{3+}) e doxorrubicina.

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa são igualmente áreas complexas, para as quais é fulcral o papel que a nanotecnologia desempenha no desenvolvimento de sistemas que mimetizam o tecido originário. Obter uma veiculação localizada e controlada de fatores biológicos em *scaffolds* 3D é um dos pontos-chave para a regeneração e crescimento tecidual e as NPP encapsuladas com os mesmos têm demonstrado a sua capacidade para este fim. Prova disso é o estudo realizado por Kim et al. (2014) que demonstra que a encapsulação de nanoesferas de sílica em biopolímeros retarda a libertação de fatores de crescimento, permitindo doses contínuas dos mesmos, fundamentais para a reparação e regeneração dos tecidos. É importante referir que além de serem utilizadas como sistemas de veiculação nesta área, as NPP podem ter igualmente um papel de destaque na construção de *scaffolds* biomiméticos.

Por último, o papel da nanotecnologia na veiculação de fármacos é talvez uma das áreas com maior investigação e destaque. Os sistemas de veiculação de fármacos baseados em NPP permitem ultrapassar as limitações associadas às terapêuticas atuais das mais diversas patologias, especialmente no que respeita aos anticancerígenos, à terapêutica de doenças neurodegenerativas e aos anti-infecciosos. A sua aplicação em áreas onde as terapêuticas convencionais falharam, ou onde estes sistemas de veiculação comprovaram ser vantajosos tem vindo a ser um sucesso. Através dos diferentes estudos apresentados ao longo do trabalho, foi possível concluir que as NPP melhoram efetivamente as propriedades destas terapêuticas e a versatilidade que lhes está associada permite a sua administração por diversas vias. Desta forma, pretende-se obter tratamentos que conjuguem, simultaneamente, uma maior eficácia e segurança.

As NPP têm vindo a revelar, desta forma, o seu potencial quando aplicadas em diferentes áreas da medicina, tanto a nível do diagnóstico, como da terapêutica e, até mesmo, na combinação de ambos. A enorme investigação que lhes está associada e os resultados positivos já obtidos fazem das NPP uma estratégia atrativa para, futuramente, ultrapassar diversas lacunas que a medicina possui no presente, aliando sempre a segurança e menor toxicidade a uma superior eficácia.

5. BIBLIOGRAFIA

- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126–2146. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007>
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., & Tan, W. (2012). Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7(8), 1253–1271. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.87>
- Banik, B. L., Fattahi, P., & Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(2), 271–299. <https://doi.org/10.1002/wnan.1364>
- Barreto, J. A., O'Malley, W., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H., & Spiccia, L. (2011). Nanomaterials: Applications in cancer imaging and therapy. *Advanced Materials*, 23(12). <https://doi.org/10.1002/adma.201100140>
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. Em *Natural polymer drug delivery systems* (pp. 33–93). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>
- Biemar, F., & Foti, M. (2013). Global progress against cancer-challenges and opportunities. *Cancer Biology & Medicine*, 10(4), 183–6. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.04.001>
- Bildstein, L., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2011). Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.12.005>
- Cheng, L., Jin, C., Lv, W., Ding, Q., & Han, X. (2011). Developing a highly stable PLGA-mPEG nanoparticle loaded with cisplatin for chemotherapy of ovarian cancer. *PLoS ONE*, 6(9), e25433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025433>
- de Vries, A., Custers, E., Lub, J., van den Bosch, S., Nicolay, K., & Grull, H. (2010).

- Block-copolymer-stabilized iodinated emulsions for use as CT contrast agents. *Biomaterials*, 31(25), 6537–6544. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.056>
- deKrafft, K. E., Xie, Z., Cao, G., Tran, S., Ma, L., Zhou, O. Z., & Lin, W. (2009). Iodinated nanoscale coordination polymers as potential contrast agents for computed tomography. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(52), 9901–9904. <https://doi.org/10.1002/anie.200904958>
- Desai, N. (2012). Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *The AAPS Journal*, 14(2), 282–295. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9339-4>
- Dhar, S., Gu, F. X., Langer, R., Farokhzad, O. C., & Lippard, S. J. (2008). Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45), 17356–17361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809154105>
- Dudhamal, S. S., Khadkutkar, V., & Bhange, M. (2015). An advanced nanotechnology for cancer therapy : A review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(11), 668–686. Disponível em <http://www.wjpr.net/>
- Elsabahy, M., & Wooley, K. L. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2545–2561. <https://doi.org/10.1039/c2cs15327k>
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2012). The perpetual challenge of infectious diseases. *New England Journal of Medicine*, 366(5), 454–461. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1108296>
- Fonseca-Santos, B., Gremiao, M. P. D., & Chorilli, M. (2015). Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4981–5003. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87148>
- Gao, W., Thamphiwatana, S., Angsantikul, P., & Zhang, L. (2014). Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(6), 532–547. <https://doi.org/10.1002/wnan.1282>

- Goldsmith, M., Abramovitz, L., & Peer, D. (2014). Precision nanomedicine in neurodegenerative diseases. *ACS Nano*, 8(3), 1958–1965. <https://doi.org/10.1021/nn501292z>
- Kim, T. H., Eltohamy, M., Kim, M., Perez, R. A., Kim, J. H., Yun, Y. R., ... Kim, H. W. (2014). Therapeutic foam scaffolds incorporating biopolymer-shelled mesoporous nanospheres with growth factors. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2612–2621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.005>
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/C2CS15261D>
- Lee, N., & Hyeon, T. (2012). Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2575–2589. <https://doi.org/10.1039/C1CS15248C>
- Li, Y., Lin, T., Luo, Y., Liu, Q., Xiao, W., Guo, W., ... Lam, K. S. (2014). A smart and versatile theranostic nanomedicine platform based on nanoporphyrin. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5712>
- Liu, Y., Ai, K., & Lu, L. (2012). Nanoparticulate X-ray computed tomography contrast agents: From design validation to in vivo applications. *Accounts of Chemical Research*, 45(10), 1817–1827. <https://doi.org/10.1021/ar300150c>
- Liu, Y., Chen, Z., Liu, C., Yu, D., Lu, Z., & Zhang, N. (2011). Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Biomaterials*, 32(22), 5167–5176. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.077>
- Ma, P. X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 184–198. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041>
- Masood, F. (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering C*, 60, 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.067>
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for

- drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1), 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Mura, S., & Couvreur, P. (2012). Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1394–1416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>
- Murugan, R., & Ramakrishna, S. (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, 65(15–16), 2385–2406. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.07.022>
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S., & Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 16–23. Disponível em <https://www.ajpcr.com/>
- Nair K, L., Jagadeeshan, S., Nair, S. A., & Kumar, G. S. V. (2011). Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1685–1697. <https://doi.org/10.2147/IJN.S20165>
- Nasir, A., Kausar, A., & Younus, A. (2015). A review on preparation, properties and applications of polymeric nanoparticle-based materials. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 54(4), 325–341. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.958780>
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>
- Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(2), 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
- Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 701–705. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.006>

- Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). Nanoparticles as drug carriers. In *Nanoparticulate Drug Delivery: perspectives on the transition from laboratory to market* (pp. 29–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.29>
- Prabhu, R. H., Patravale, V. B., & Joshi, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 1001–1018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56932> [doi]
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, *36*(7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., & Savolainen, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>
- Rudin, M., & Weissleder, R. (2003). Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, *2*(2), 123–131. <https://doi.org/10.1038/nrd1007>
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, *235*, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Shalviri, A., Foltz, W. D., Cai, P., Rauth, A. M., & Wu, X. Y. (2013). Multifunctional terpolymeric MRI contrast agent with superior signal enhancement in blood and tumor. *Journal of Controlled Release*, *167*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.014>
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letters*, *10*(9), 3223–3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>
- Shibata, A., McMullen, E., Pham, A., Belshan, M., Sanford, B., Zhou, Y., ... Destache, C. J. (2013). Polymeric nanoparticles containing combination antiretroviral drugs for HIV type 1 treatment. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *29*(5), 746–54. <https://doi.org/10.1089/aid.2012.0301>

- Singh, L., Kruger, H. G., Maguire, G. E., Govender, T., & Parboosing, R. (2017). The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 4(4), 105–131. <https://doi.org/10.1177/>
- Singh, A., Garg, G., & Sharma, P. K. (2010). Nanospheres: a novel approach for targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5(3), 84–88. Disponível em <http://www.globalresearchonline.net/>
- Srikar, R., Upendran, A., & Kannan, R. (2014). Polymeric nanoparticles for molecular imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(3), 245–267. <https://doi.org/10.1002/wnan.1259>
- Steinbach, J. M., Weller, C. E., Booth, C. J., & Saltzman, W. M. (2012). Polymer nanoparticles encapsulating siRNA for treatment of HSV-2 genital infection. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.008>
- Tao, L., Hu, W., Liu, Y., Huang, G., Sumer, B. D., & Gao, J. (2011). Shape-specific polymeric nanomedicine: emerging opportunities and challenges. *Experimental Biology and Medicine*, 236(1), 20–29. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010243>
- Toti, U. S., Guru, B. R., Hali, M., McPharlin, C. M., Wykes, S. M., Panyam, J., & Whittum-Hudson, J. A. (2011). Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. *Biomaterials*, 32(27), 6606–6613. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.038>
- Trapani, A., De Giglio, E., Cafagna, D., Denora, N., Agrimi, G., Cassano, T., ... Trapani, G. (2011). Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1–2), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.036>
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49(12), 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Vieira, S., Vial, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2017). Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnology Progress*, 33(3), 590–611. <https://doi.org/10.1002/btpr.2469>

- Wang, J., Feng, S. S., Wang, S., & Chen, Z. Y. (2010). Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.026>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- World Health Organization. (2017). *Cancer* [Fact Sheet]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- World Health Organization. (2017). *HIV/AIDS* [Fact Sheet]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>
- Yin, Q., Yap, F. Y., Yin, L., Ma, L., Zhou, Q., Dobrucki, L. W., ... Cheng, J. (2013). Poly(iohexol) nanoparticles as contrast agents for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 135(37), 13620–13623. <https://doi.org/10.1021/ja405196f>
- Zhang, C., Wan, X., Zheng, X., Shao, X., Liu, Q., Zhang, Q., & Qian, Y. (2014). Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials*, 35(1), 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.063>
- Zhang, H. W., Wang, L. Q., Xiang, Q. F., Zhong, Q., Chen, L. M., Xu, C. X., ... Deng, D. Y. B. (2014). Specific lipase-responsive polymer-coated gadolinium nanoparticles for MR imaging of early acute pancreatitis. *Biomaterials*, 35(1), 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.046>
- Zhu, D., Liu, F., Ma, L., Liu, D., & Wang, Z. (2013). Nanoparticle-based systems for T1-weighted magnetic resonance imaging contrast agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10591–10607. <https://doi.org/10.3390/ijms140510591>