

Ana Alexandra de Azevedo Miranda

Aplicações da Nanotecnologia em Doenças do Foro Neurológico: Vantagens e Desafios

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



Eu, Ana Alexandra de Azevedo Miranda, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2009010741, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer informação ou expressão, por mim utilizada está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de Julho de 2014

Assinatura

Trabalho desenvolvido sob orientação científica da Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras, no âmbito da unidade de Estágio Curricular em Ciências Farmacêuticas.

A Tutora,

(Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras)

A Aluna,

(Ana Alexandra de Azevedo Miranda)

*Dedico este trabalho a uma das pessoas mais importantes da minha vida,
a minha mãe,
que infelizmente não pôde presenciar o término do meu percurso acadêmico,
mas tenho a certeza de que, onde quer que esteja, estará orgulhosa e feliz.*

É com sincera gratidão que deixo aqui um especial agradecimento:

*À Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras,
que tanto contribuiu para a minha formação académica. Um sincero Obrigado por todos os desafios
e oportunidades, pela total disponibilidade, orientação e exigência que sempre demonstrou;*

*À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e aos seus Professores,
por todos os conhecimentos transmitidos e partilhados;*

*Ao meu Pai,
ao meu verdadeiro herói, que é o principal responsável por esta minha conquista. Um Obrigado por
todo o esforço, dedicação e apoio, pelas palavras sábias, por tornar possível a concretização deste
sonho e pela presença em todos os momentos importantes da minha vida;*

*Ao meu irmão Luís,
o meu “pequenino”, por estar sempre do meu lado,
por ser o meu grande pilar e fonte de motivação constante;*

*Ao Tiago,
pela presença em todos os momentos, pelo carinho, apoio e motivação constante ao longo do meu
percurso académico e pela paciência nos meus momentos de maior aflição;*

*Aos meus amigos,
por me acompanharem ao longo destes fantásticos 5 anos e me proporcionarem todos os
momentos inesquecíveis;*

*A Coimbra,
O meu sincero obrigado por tudo. Certamente que levarei esta cidade no coração!*

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT	2
LISTA DE ACRÓNIMOS	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS	6
2.1. Micelas Poliméricas	10
2.2. Nanopartículas Poliméricas	12
2.3. Lipossomas	14
2.4. Dendrímeros	16
3. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS EM ALVOS NEUROLÓGICOS	
3.1. Alzheimer	18
3.2. Glioblastoma	20
3.3. Paralisia Cerebral	21
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	28

RESUMO

A incidência e prevalência das doenças neurológicas têm vindo a aumentar com a esperança média de vida. No entanto, desenvolver estratégias terapêuticas para entrega de fármacos no Sistema Nervoso Central (SNC) tem sido um constante desafio devido à baixa permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE). Neste sentido, a nanotecnologia têm-se tornado promissora na medida em que tem vindo a possibilitar o desenvolvimento de partículas à escala nanométrica que, devido ao seu tamanho reduzido, conseguem interagir com os sistemas biológicos a um nível molecular. As micelas e as nanopartículas poliméricas, os lipossomas e os dendrímeros são alguns desses nanovetores que têm ganho relevância na área da neurociência como possíveis *Drug Delivery Systems* (DDS). Contudo a modificação das suas estruturas torna-se essencial não só para aumentar a estabilidade e o seu tempo de circulação na corrente sanguínea, como também para adquirirem especificidade de ação e promoverem um direcionamento para o tecido patológico alvo.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central; Barreira Hematoencefálica; Micelas Poliméricas; Nanopartículas Poliméricas; Lipossomas; Dendrímeros; *Drug Delivery Systems*.

ABSTRACT

The incidence and prevalence of neurological disorders has been increasing with life expectancy. The development of therapeutic strategies to drug delivery in the central nervous system (CNS) has been a constant challenge due to the weak permeability of the Blood-Brain Barrier (BBB). In this regard, nanotechnology has become promising by enabling the development of particles at nano-scale, which due to their small size, can interact with biological systems at the molecular level. Polymeric micelles and polymeric nanoparticles, liposomes and dendrimers are some of these nanosystems that have been gaining importance in neuroscience as potential drug delivery systems (DDS). However the modification of their structure is essential, not only to increase their stability and circulation time in the bloodstream, as well as to acquire specificity and to promote targeted delivery of drugs to the brain tissue.

Key words: Central Nervous System; Blood-Brain Barrier; Polymeric Micelles; Polymeric Nanoparticles; Liposomes; Dendrimers; *Drug Delivery Systems*.

LISTA DE ACRÓNIMOS

- Apo E** – Apolipoproteína E
- BHE** – Barreira Hematoencefálica
- CMC** – Concentração Micelar Crítica
- DDS** – Drug Delivery Systems
- DSPE** – Diesteril-fosfatidiletanolamina
- EPR** – Efeito de Permeabilidade e Retenção
- FDA** – Food and Drug Administration
- GBM** – Glioblastoma Multiforme
- LUVs** – Vesículas unilamelares grandes
- LDL** – Lipoproteína de Baixa densidade
- MP** – Micelas Poliméricas
- MLVs** – Vesículas multilamelares
- NAC** – N-acetilcisteína
- NP** – Nanopartículas Poliméricas
- PAMAM** – poli(amidoamina)
- PBCA** – poli(n-butil-cianoacrilato)
- PCL** – poli(caprolactona)
- PE** – fosfatidiletanolamina
- PEG** – polietilenoglicol
- PEO** – óxido de polietileno
- PGA** – ácido poliglicólico
- PLA** – ácido poliláctico
- PLGA** – Ácido poliláctico-co-glicólico
- PPO** – óxido de polipropileno
- RES** – Sistema Reticuloendotelial
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SUVs** – Vesículas unilamelares pequenas

I. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que tem vindo a ganhar interesse nos últimos anos, principalmente na área médica, farmacêutica e química, apesar de este conceito já ter sido introduzido há mais de 40 anos. ⁽¹⁾ Esta ciência permite a manipulação da matéria à escala atómica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos à escala nanométrica (1-100 nm, geralmente). No domínio médico-farmacêutico, a nanotecnologia aborda sobretudo a caracterização, manipulação, preparação e aplicação de estruturas biológicas, nomeadamente as nanopartículas referidas no presente trabalho. ⁽²⁾ (Figura 1)

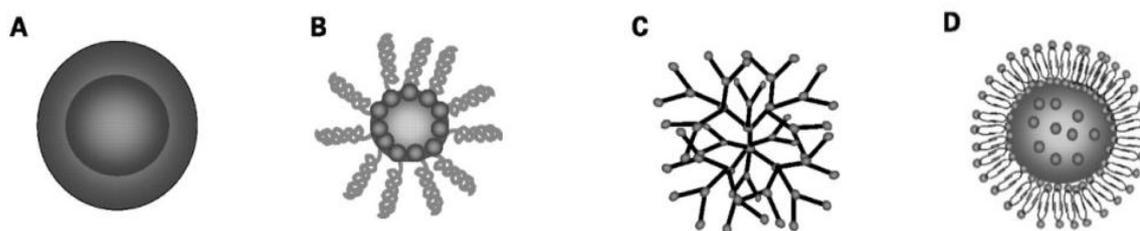


Figura 1 – Diferentes tipos de nanopartículas para transporte de fármacos. (A) Nanopartículas Poliméricas; (B) Micelas Poliméricas; (C) Dendrímeros; (D) Lipossomas. ⁽³⁾

A nanotecnologia tem sido amplamente aplicada, principalmente na área dos *Drug Delivery Systems* (DDS), uma vez que as nanopartículas são capazes de interagir com sistemas biológicos a um nível molecular, podendo estimular, responder e interagir com as células-alvo e tecidos para induzir respostas fisiológicas desejadas. ⁽⁴⁾ Desta forma, a nanotecnologia tem sido utilizada a nível terapêutico para diversas patologias, e ainda a nível de diagnóstico e imagem, sendo que a aplicação mais promissora atualmente passa pelo transporte de nanosistemas através da barreira hematoencefálica (BHE). ⁽⁵⁾

A incidência de doenças neurológicas, tais como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e o glioblastoma, está a aumentar rapidamente com o aumento progressivo da esperança média de vida. No entanto, as intervenções tendo como alvo terapêutico o sistema nervoso central (SNC) continuam a ser um desafio, devido à dificuldade que os fármacos apresentam em atingir o cérebro. ⁽⁶⁾ O SNC é um sistema complexo e vulnerável, protegido por uma barreira biológica, a BHE, que constitui um ótimo mecanismo de defesa do cérebro contra moléculas externas que possam provocar qualquer tipo de dano cerebral, sendo por isso bastante seletiva na passagem de moléculas entre a corrente sanguínea e o cérebro. ⁽⁶⁾ No entanto, este mecanismo defensivo complica as tentativas de realizar

estratégias terapêuticas com objetivo de alcançar o cérebro e de exercerem as suas ações farmacológicas em alvos neurológicos.

A BHE é formada por uma monocamada de células endoteliais ligadas umas às outras através das junções de oclusão, tendo contato direto ou indireto com os terminais dos astrócitos, neurónios perivascularares e periócitos. ⁽⁶⁾ (Figura 2-A). As células endoteliais do cérebro são altamente polarizadas e apresentam baixa atividade pinocítica, no entanto contêm diferentes mecanismos de transporte ativo para garantir a homeostase do cérebro; para além disso, também possuem grandes concentrações de glicoproteína-P, que é uma proteína dependente de ATP responsável pelo transporte ativo envolvido no efluxo de múltiplos fármacos, incluindo os quimioterápicos. ⁽⁷⁾ (Figura 2-B)

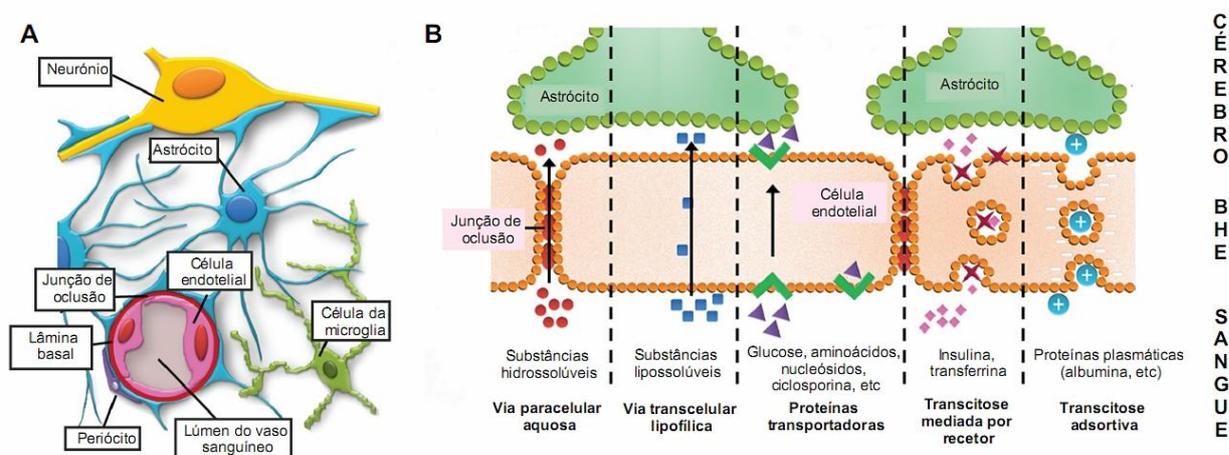


Figura 2 – (A) Estrutura da BHE, com visualização das células endoteliais dos capilares sanguíneos e das suas junções de oclusão; (B) Diferentes mecanismos de transporte de moléculas através da BHE. ⁽⁶⁾

As nanopartículas, devido ao seu reduzido tamanho, têm sido consideradas como possíveis estratégias terapêuticas para passar a BHE e atingir o cérebro. No entanto, a modificação das suas estruturas tornou-se essencial para aumentar a especificidade e seletividade, promovendo assim uma libertação mais eficaz e direcionada dos fármacos nos tecidos alvo. Uma das modificações mais comuns é a adição de ligandos à superfície das nanopartículas para que possam interagir diretamente com as células endoteliais, como é o caso da transferrina, insulina e tiamina, que têm recetores específicos na BHE. ⁽⁸⁾ Investigadores verificaram que, desta interação entre as nanopartículas com ligandos e os recetores correspondentes, criam-se vesículas endocíticas que promovem a transcitose através das células da BHE, levando por fim à libertação das nanopartículas no cérebro por exocitose. ⁽⁸⁾

A presente monografia tem como principal objetivo fazer uma abordagem dos principais sistemas nanoparticulados que se consideram promissores no transporte de

fármacos até ao cérebro. O objetivo é focar as principais características de cada um deles e valorizar o que a nanotecnologia pode proporcionar na melhoria do tratamento e prevenção de diferentes patologias do foro neurológico.

2. NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS

Atualmente existem vários tipos de nanosistemas com potencial para transportar, de forma específica, fármacos ou outras moléculas até ao cérebro. ⁽⁴⁾ Esses nanosistemas são desenvolvidos à escala nanométrica (abaixo de 1 μm), podendo ser constituídos por diferentes materiais biodegradáveis tais como polímeros naturais ou sintéticos, lípidos (como por exemplo fosfolípidos) e compostos organometálicos. ⁽⁹⁾

De um modo geral, as nanopartículas são consideradas veículos excelentes para o transporte e libertação de fármacos devido às inúmeras vantagens que apresentam. ⁽⁹⁾ Entre estas destacam-se:

- a) a elevada estabilidade química e biológica bem como a ausência de toxicidade e de imunogenicidade;
- d) a maior eficácia terapêutica, no sentido em que promovem um aumento da solubilidade dos fármacos, a proteção dos mesmos relativamente à degradação enzimática e uma alteração do seu perfil farmacocinético e do perfil de administração: favorecendo uma maior distribuição, especificidade e libertação constante e controlada dos fármacos, diminuindo consequentemente a dose administrada;
- e) a capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, como fármacos, siRNA, DNA e proteínas, minimizando assim os efeitos secundários associados ao fármaco livre, e portanto a sua citotoxicidade;
- f) a capacidade de administração por diferentes vias, quer oral, inalatória ou parenteral, assim como o aumento da especificidade para atingir determinados alvos biológicos;
- h) o tamanho reduzido, que lhes permite chegar a áreas profundas do organismo e ultrapassar diferentes estruturas anatómicas, tais como a BHE;
- i) a facilidade de manipulação quer do tamanho, quer da sua composição. ^{(2) (9) (10)}

Embora todas estas vantagens sejam significativas, existem também algumas limitações que devem ser levadas em consideração no desenvolvimento destes sistemas. A possível

toxicidade dos produtos resultantes da sua degradação, a incompatibilidade biológica dos materiais utilizados, os custos mais elevados (dependendo do material e do processo de obtenção) comparativamente às formulações farmacêuticas convencionais e o baixo tempo de circulação na corrente sanguínea devido ao rápido *uptake* por parte do sistema reticuloendotelial (RES), proporcionam desafios constantes à ciência no sentido de se tentar alcançar estratégias para ultrapassar as limitações evidenciadas e melhorar as suas características menos apropriadas. ^{(11) (3)}

Para controlar as propriedades das nanopartículas *in vivo*, são efetuadas frequentemente modificações nas suas estruturas. ⁽¹²⁾ Esta manipulação permite ajustar as suas características de acordo com o local patológico onde vão atuar e consoante a sua finalidade, ou seja, diagnóstico ou terapêutica, tendo os seguintes objetivos:

I) Aumentar a estabilidade e o tempo de circulação das nanopartículas na corrente sanguínea ⁽¹²⁾ – A PEGuilação é uma das estratégias mais utilizadas neste sentido. Modificar a estrutura das nanopartículas com a adição do polímero sintético Polietilenoglicol (PEG) resulta na formação de uma camada polimérica à superfície da nanopartícula que é impermeável para outros solutos, mesmo em concentrações relativamente baixas de polímero. ⁽¹²⁾ Por outro lado, o PEG impede a interação e ligação dos componentes do sangue com a superfície da nanopartícula através de repulsões estéricas, prevenindo a opsonização da nanopartícula e a sua captura pelo RES, que não é mais do que um sistema mononuclear fagocitário constituído por um diverso grupo de células localizadas em diferentes tecidos do organismo. Esta estratégia permite à nanopartícula circular por mais tempo na corrente sanguínea sem ser reconhecida, evitando assim a sua rápida *clearance* por parte do organismo. ^{(13) (14)}

II) Direcionar as nanopartículas para o tecido patológico alvo, através da incorporação de ligandos à superfície das mesmas, que apresentam seletividade para determinados recetores ou moléculas de superfície das células alvo. ⁽¹²⁾ Estes ligandos permitem controlar a biodistribuição da nanopartícula e a sua captação específica pelas células no local ativo, podendo ser açúcares, peptídeos, proteínas, aptâmeros, anticorpos monoclonais, entre outros, como demonstrado a figura 3. ⁽¹⁵⁾ Existem, no entanto, alguns problemas que devem ser considerados na conceção destes sistemas: o ligando à superfície da nanopartícula pode aumentar o *uptake* pelo RES, apesar de estar protegido estericamente; pode facilitar o desenvolvimento de uma resposta imunitária indesejável, dependendo do tipo de ligando e

da composição da nanopartícula; a quantidade de ligando pode tornar-se num fator crítico para assegurar o êxito da ligação ao alvo, mantendo uma circulação prolongada da nanopartícula na corrente sanguínea. ⁽¹²⁾

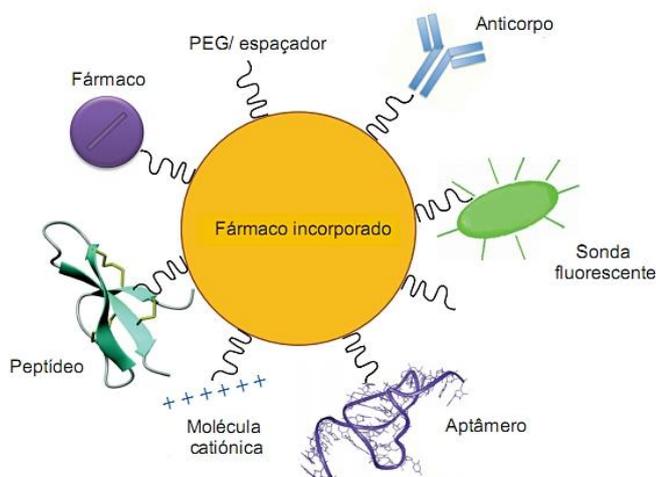


Figura 3 – Representação de uma nanopartícula modificada com adição de fármaco (incorporado dentro do núcleo ou conjugado à superfície) e ligandos (como anticorpos, peptídeos, aptâmeros e moléculas catiónicas), para além do PEG e da sonda fluorescente. ⁽¹⁰⁾

III) Conferir às nanopartículas sensibilidade a determinados estímulos intrinsecamente característicos da área patológica, como a temperatura e pH, ou estímulos externos aplicados nessa mesma área, como a ultrassonografia. ⁽¹⁵⁾ Dependendo do estímulo, diferentes respostas podem ser observadas, como a rutura da estrutura da nanopartícula e alterações da sua forma, volume, taxa de permeação, estado de hidratação e alterações de estados conformacionais. ⁽¹⁵⁾ Esta estratégia permite que a libertação dos fármacos a partir das nanopartículas se torne dependente das características fisiológicas exclusivas dos tecidos patológicos, e que portanto não são verificadas em tecidos saudáveis. ⁽¹⁵⁾ Neste sentido, os chamados polímeros inteligentes, ou polímeros *stimule-responsive*, têm sido amplamente utilizados na preparação das nanopartículas, uma vez que apresentam uma resposta ativa a pequenos sinais e alterações do ambiente circundante, sofrendo alterações drásticas na sua microestrutura que conduzem a modificações desejáveis nas suas propriedades físico-químicas, sendo estas transições reversíveis. ⁽¹⁶⁾

Este mecanismo tem apresentado especial relevância na terapêutica antineoplásica. Nesta situação, as nanopartículas têm de passar da corrente sanguínea para o interstício tumoral e, em muitos casos, têm de entrar nos endossomas. No entanto, cada compartimento tem o seu próprio pH: o pH do sistema endossomal (entre 5.0 e 6.0) é substancialmente menor do que o pH fisiológico (isto é, pH 7.4) e o pH extracelular de tumores sólidos (isto é, 6.8). ⁽¹⁷⁾ Aparentemente estas variações de pH causariam

instabilidade na nanopartícula e inclusive afetariam o seu transporte ao longo da corrente sanguínea até chegar ao alvo terapêutico. No entanto, estudos já realizados demonstraram que um revestimento da nanopartícula com PEG é reversivelmente removido a pH de 6.8 e reconstituído a pH 7.4. É de salientar que uma nanopartícula desta natureza pode ser alterada para fornecer informações sobre o pH de um determinado compartimento biológico, o que poderá ser importante em vários aspectos, tais como a compreensão da resistência aos medicamentos para agentes quimioterápicos que são sensíveis ao pH. ⁽¹⁷⁾ Um outro exemplo diz respeito à ocorrência de isquemia cerebral após uma acidose láctica, em que o pH diminui drasticamente, sendo este tipo de nanopartículas uma boa estratégia para alcançar a zona afetada e poder atuar. ⁽⁶⁾

IV) Adicionar agentes de contraste às nanopartículas, fornecendo informação visual em tempo real sobre a sua distribuição e acumulação no tecido alvo. ⁽¹²⁾ Esta estratégia, conhecida como teranóstico, é bastante promissora no sentido em que faz uso das nanopartículas para construir uma plataforma de tratamento que combina um diagnóstico *in situ*, através de imagiologia, com uma terapia específica, através da encapsulação de fármaco e com a monitorização da resposta a essa terapia. ⁽¹²⁾ Os agentes de contraste mais comumente utilizados são as partículas de óxido de ferro e quelatos de gadolínio, enquanto que os nanossistemas com maior sucesso no teranóstico são as micelas, os lipossomas e mais recentemente os dendrímeros. ^{(12) (6)}

A maioria dos distúrbios neurológicos é focal e por isso só afeta um determinado órgão, tecido ou até mesmo uma só linhagem celular específica, como por exemplo os neurónios dopaminérgicos da substância negra na doença de Parkinson. ⁽⁶⁾ Desta forma, o teranóstico baseia-se no seguinte: administração sistémica das nanopartículas que se distribuem pelo organismo; a sua capacidade de alcançar o local da patologia, através de modificações estratégicas na sua estrutura, e facilidade em concentrar o fármaco no local desejado; uso das tecnologias de imagem, como a ressonância magnética de imagem ou tomografia, para visualizar o percurso das nanopartículas no organismo, bem como localizar, delinear e quantificar a zona lesada e monitorizar a progressão da patologia em resposta ao tratamento. ⁽⁶⁾ (Figura 4)

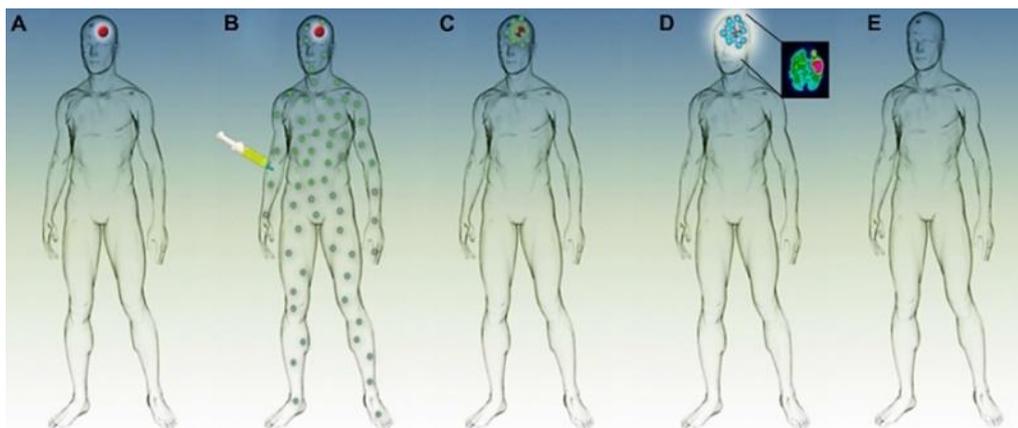


Figura 4 – Esquema representativo do conceito de teranóstico. (6)

2.1 Micelas Poliméricas

Nos últimos anos, as micelas poliméricas (MP) têm surgido como *Drug Delivery Systems* (DDS) promissores, com principal destaque na área de oncologia, devido à sua estrutura tão peculiar, tendo uma aplicação vasta no transporte de proteínas, material genético e fármacos hidrofóbicos. (18)

Estas nanopartículas são obtidas a partir de copolímeros anfífilicos em bloco, que se agregam espontaneamente em meio aquoso acima de uma certa concentração, designada por Concentração Micelar Crítica (CMC), formando-se assim uma estrutura esférica com um núcleo interior hidrofóbico rodeado por uma camada exterior hidrofílica, e com um diâmetro compreendido entre 10-100nm. (14) (15) (Figura 5) Este processo de micelização é influenciado por vários fatores, entre os quais o tamanho da porção hidrofóbica, a concentração dos compostos anfífilicos, a temperatura e a solução envolvente. Por outro lado, o tamanho da micela formada depende do peso molecular dos copolímeros anfífilicos, do número de agregados formados entre eles, da proporção entre o número de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, bem como do processo de preparação. (15) As interações hidrofóbicas são as principais forças responsáveis pela formação das micelas. No entanto outras forças intermoleculares como ligações de hidrogénio e interações eletrostáticas também estão presentes, de modo a promover uma maior estabilidade da estrutura. (13)

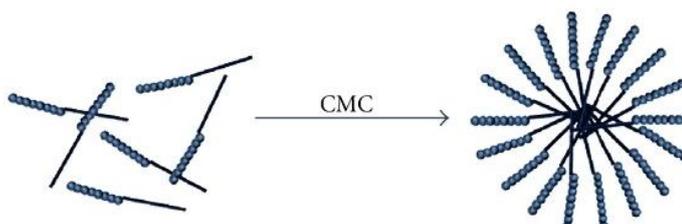


Figura 5 – Processo de formação de micelas (19)

O núcleo hidrofóbico das MP apresenta elevada capacidade para encapsular fármacos hidrofóbicos (até 20-30% do peso da nanopartícula) através de ligações covalentes aos copolímeros ou por incorporação física no interior do núcleo, aumentando a solubilidade aquosa dos mesmos; ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁰⁾ por outro lado, o exterior hidrofílico serve como interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo aquoso devido às forças repulsivas que exerce. ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁸⁾ Assim sendo, as MP são sistemas com elevado potencial para transportar fármacos que apresentam fraca solubilidade em água, melhorando a biodisponibilidade oral bem como a farmacocinética desses fármacos no organismo. ⁽¹⁵⁾

Ao contrário das micelas surfactantes convencionais, as MP apresentam baixo valor de CMC e também ligações covalentes entre os monómeros que constituem o núcleo hidrofóbico, evitando assim trocas dinâmicas de monómeros entre a solução livre e a pseudo-fase micelar, conferindo desta forma rigidez e estabilidade à micela em meio aquoso. ⁽¹³⁾ ⁽¹⁵⁾ Além disso, também não apresentam citotoxicidade e permitem a conjugação com uma multiplicidade de grupos funcionais que oferecem vantagens terapêuticas. ⁽¹⁸⁾

Vários copolímeros têm sido utilizados na formação de micelas. No entanto, o facto de haver a necessidade da presença de características biodegradáveis e biocompatíveis nas nanopartículas para aplicação clínica tem limitado a escolha dos copolímeros. ⁽²¹⁾ Para o segmento hidrofóbico, o mais comum é a utilização de derivados de poliésteres, poliéteres e de polipeptídeos. Os poliésteres, como o ácido poliláctico (PLA), a poli(caprolactona) (PCL), o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) e o ácido poliglicólico (PGA) apresentam a vantagem de estarem aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações biomédicas. ⁽¹³⁾ Por outro lado, o polietilenoglicol (PEG) é utilizado como segmento hidrofílico na maioria das MP, uma vez que não possui imunogenicidade nem toxicidade, para além da vantagem já acima mencionada relativamente à capacidade de aumentar o tempo de circulação da MP na corrente sanguínea. ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾

Os polímeros acima mencionados podem apresentar-se sob a forma de di-blocos, tri-blocos ou estruturas ainda mais complexas. De entre os materiais anfifílicos mais utilizados atualmente, encontram-se os copolímeros hidrofílicos derivados de óxido de polietileno (PEO) e os derivados hidrofóbicos de óxido de polipropileno (PPO), dando especial destaque ao Pluronic[®], que é caracterizado por apresentar uma linear e bifuncional tricamada PEO-PPO-PEO. Estudos já realizados demonstraram que o uso de Pluronic[®] pode ser vantajoso em situações oncológicas, uma vez que em baixas concentrações tem a capacidade de contrariar as múltiplas resistências a fármacos desenvolvidas pelas células cancerígenas que estiveram expostas repetidamente a agentes quimioterápicos. ⁽¹⁴⁾

Para além das inúmeras vantagens já mencionadas relativamente às nanopartículas em geral, e que portanto também se adequam às MP, estas últimas apresentam também algumas particularidades. A preparação das MP é realizada facilmente em grandes quantidades e de forma reprodutível, para além da flexibilidade na modificação da morfologia, permitindo facilmente um ajuste da estrutura dos copolímeros anfifílicos quando necessário. ^{(15) (18)}

Como limitações, as MP apresentam alguma instabilidade devido à sua estrutura reversível composta por ligações não covalentes, para além do facto de só demonstrarem vantagem no transporte de fármacos hidrofóbicos. Por outro lado, as MP, tal como grande parte das nanopartículas, estão sujeitas a uma rápida *clearance* (que pode ser minimizada pela adição de PEG à sua estrutura). ⁽¹⁴⁾ No entanto, é a sua baixa toxicidade e a rápida taxa de *clearance* que as tornam adequadas para transportar fármacos por via intravenosa. ⁽¹⁵⁾

2.2 Nanopartículas Poliméricas

Desenvolvidas na década de 90, as nanopartículas poliméricas (NP) têm ganho importância não só pela capacidade de transportar fármacos em geral, mas porque têm sido consideradas transportadores promissores para o sistema nervoso central (SNC). ⁽⁷⁾ As NP são sistemas coloidais com um tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm (geralmente 200 nm), sendo compostas por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. ^{(9) (7)}

Nanopartículas poliméricas é uma expressão coletiva que engloba dois tipos de estruturas diferentes, nomeadamente nanocápsulas e nanoesferas, que diferem entre si na composição e organização estrutural. ⁽²²⁾ As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas densas onde o fármaco é disperso uniformemente, sendo depois libertado por difusão. Por outro lado, as nanocápsulas constituem sistemas reservatório com um núcleo líquido diferenciado, geralmente oleoso e onde o fármaco é dissolvido, sendo esse núcleo envolvido por uma fina membrana polimérica. ^{(23) (4)} (Figura 6) As vantagens das nanocápsulas relativamente às nanoesferas devem-se ao facto das nanocápsulas terem a capacidade de incorporar fármacos na forma líquida ou sólida, como uma dispersão molecular; o baixo conteúdo de polímeros, diminuindo possíveis toxicidades; e a maior capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos, devido ao seu núcleo lipofílico. ⁽²⁴⁾

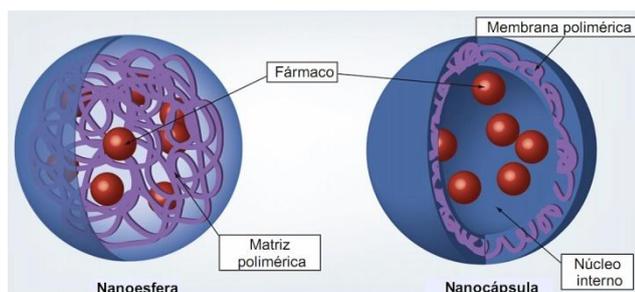


Figura 6 – Ilustração dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: nanoesferas e nanocápsulas. ⁽²⁵⁾

A liberação do fármaco por parte das NP é influenciada quer pelas propriedades do polímero utilizado, relativamente ao seu perfil de biodegradação, distribuição da massa molecular e hidrofobicidade, quer pelas próprias propriedades do fármaco. ⁽²⁶⁾ Assim sendo, com o objetivo de se alcançar uma liberação controlada de fármaco, o uso de polímeros naturais convencionais, como o quitosano, a celulose, o alginato de sódio e o colagénio, têm vindo a ser substituído por polímeros sintéticos, igualmente biodegradáveis, como PLA, PGA, PCL e PLGA. ⁽⁷⁾ A seleção do polímero torna-se então um fator decisivo, uma vez que os polímeros naturais proporcionam uma liberação relativamente rápida do fármaco a partir da NP, pois decompõem-se em poucas horas, enquanto que os polímeros sintéticos favorecem uma liberação mais prolongada do fármaco, pois resistem à degradação pelo organismo durante dias ou até mesmo semanas. ^{(22) (26)}

Desta forma, é possível controlar as propriedades das NP através da sua composição, como o tipo de polímero usado, o respetivo peso molecular e a proporção fármaco-polímero, bem como dos grupos funcionais terminais que lhes são adicionados à estrutura para conferir determinada especificidade. ⁽²⁷⁾ Por outro lado, vários fatores podem influenciar a estabilidade das NP, e como tal a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores das nanopartículas, sob diferentes condições de armazenamento, é fundamental. Além disso, também o potencial zeta, o teor de fármaco, o tamanho de partícula, a distribuição da massa molar e o pH são parâmetros físico-químicos que devem ser tidos em conta na monitorização da estabilidade. ⁽²²⁾

A preparação das NP pode ser realizada por diferentes métodos. De uma forma geral, estes podem ser classificados em duas categorias, dependendo se as nanopartículas são preparadas diretamente a partir de reações de polimerização *in situ* de monómeros dispersos ou se a partir da precipitação de polímeros, sintéticos ou naturais, pré-formados. ⁽²⁸⁾ A preparação requer sempre a utilização de um polímero, de um ou vários solventes, de um não-solvente, de um ou mais tensoativos e de um óleo no caso de se tratar de nanocápsulas. ⁽²⁸⁾

Para além das vantagens gerais das nanopartículas, as NP destacam-se pela maior facilidade na modificação da sua estrutura e por apresentarem maior estabilidade nos fluidos gastrointestinais, quando administrada por via oral, relativamente às micelas e lipossomas. Isto deve-se ao facto das NP possuírem fortes interações moleculares, como ligações covalentes, que tornam a estrutura mais rígida e estável. ⁽⁶⁾ Para além disso, destacam-se pela capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos ou fármacos hidrofóbicos, o que não acontece nas micelas poliméricas. As NP possuem grande capacidade de incorporação de fármaco, sendo preparadas em grandes quantidades e por uma grande variedade de métodos. ⁽⁷⁾

A maior desvantagem das NP é o já conhecido *uptake* por parte do RES, levando a uma falência da terapêutica devido à concentração insuficiente de fármaco presente no sangue e que passa através da BHE. No entanto, o uso de PEG, surfactantes, como o polissorbato 80 (Tween 80[®]) e ligandos à sua superfície, podem contribuir para ultrapassar esta limitação. ⁽⁷⁾

2.3 Lipossomas

Os lipossomas foram desenvolvidos nos anos 60 e portanto constituem a primeira geração de nanosistemas para DDS. ⁽¹⁰⁾ No entanto, a sua estrutura não estagnou e vários estudos têm sido responsáveis pela evolução deste tipo de sistemas, dando origem aos mais recentes lipossomas catiónicos, imunolipossomas, virossomas, entre outros. ⁽²⁹⁾

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas que delimitam um compartimento interno aquoso, fazendo variar o seu tamanho entre nanómetros e micrómetros de diâmetro. ⁽¹⁰⁾ Desta forma, estes nanosistemas podem ser classificados em três tipos: vesículas unilamelares pequenas (SUVs), quando possuem uma única bicamada lipídica e um tamanho entre 25-100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUVs), quando possuem uma única bicamada lipídica e um tamanho entre 200-800 nm; vesículas multilamelares (MLVs), quando possuem múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas, num máximo de catorze bicamadas, com um tamanho entre 500-5000 nm. ⁽²⁹⁾ (Figura 7)

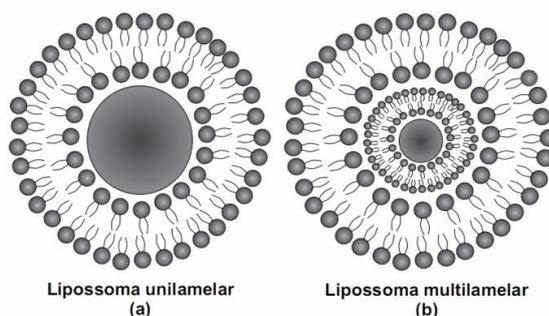


Figura 7 – Ilustração de um lipossoma unilamelar (a) e de um lipossoma multilamelar (b). ⁽²⁹⁾

Devido a esta composição anfifílica, os lipossomas podem encapsular quer fármacos hidrofílicos, quer hidrofóbicos: os primeiros são incorporados no núcleo interno aquoso enquanto que os segundos ficam inseridos ou adsorvidos nas bicamadas lipídicas.⁽³⁰⁾ No entanto, o tamanho, o número de bicamadas lipídicas e a proporção de concentrações lípidos-fármaco são fatores importantes que influenciam a eficiência da encapsulação dos fármacos nos lipossomas.^{(29) (30)} No caso dos fármacos hidrofílicos, a percentagem da sua encapsulação depende da composição da bicamada lipídica e do método de preparação do lipossoma.⁽²⁹⁾ Por outro lado, o tamanho da vesícula é um fator crítico na determinação do seu tempo de semi-vida e no transporte de moléculas, sendo que as MLVs são as primeiras a serem eliminadas da circulação sanguínea devido à fagocitose.^{(29) (31)}

Os lipossomas podem ser constituídos por diferentes tipos de lípidos. Contudo, os fosfolípidos são os mais utilizados, como a fosfatidilcolina, extraída da gema de ovo ou da soja, a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol e a esfingomielina.^{(10) (30) (32)} A formação dos lipossomas ocorre espontaneamente quando os fosfolípidos entram em contato com um meio aquoso, devido à interação hidrofílica da cabeça polar do fosfolípido com a água, levando assim à formação de estruturas unilamelares e multilamelares.^{(30) (33)}

O colesterol, um importante componente da membrana celular, é frequentemente incluído nas formulações de lipossomas com o objetivo de aumentar a estabilidade das mesmas.⁽¹⁰⁾ Assim, este esterol favorece uma melhor fluidez da bicamada lipídica, reduz a permeabilidade dessa bicamada e ainda estabiliza-a na presença de fluidos biológicos.⁽³³⁾

Associado às vantagens gerais das nanopartículas, os lipossomas destacam-se pela sua semelhança estrutural com as membranas celulares (bicamada lipídica com colesterol), facilitando uma interação profunda com as células do organismo, ou até mesmo com compartimentos celulares individuais. Por outro lado, a formulação exige baixo número de excipientes e portanto a preparação torna-se simples, para além dos lipossomas apresentarem a capacidade de incorporar quer fármacos hidrofóbicos, quer hidrofílicos.^{(7) (33)}

Apesar dos lipossomas serem nanosistemas com características benéficas para o transporte de fármacos, também apresentam alguns inconvenientes, juntamente com o rápido *uptake* por parte do RES. Estes sistemas apresentam uma baixa eficiência de encapsulação de fármacos e uma elevada instabilidade no organismo, uma vez que são muito sensíveis ao pH e à temperatura. Esta limitação torna-se relevante nomeadamente na administração oral, tendo em conta que o baixo pH do estômago e a presença dos sais biliares destabilizam a estrutura lipossómica.^{(29) (31)}

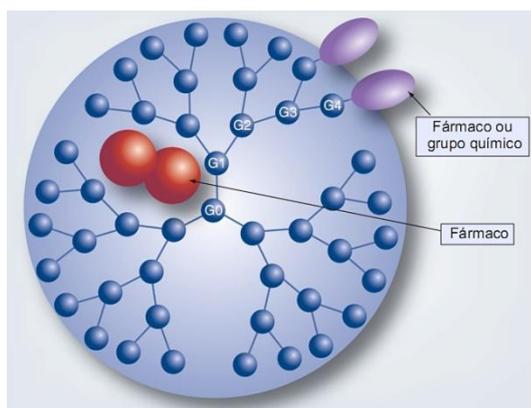
Como já foi mencionado, os lipossomas têm sofrido alterações estruturais nas últimas décadas de modo a acompanhar as necessidades terapêuticas. Primeiramente foram desenvolvidos os lipossomas com PEG. No entanto, após estudos terem revelado que essas estruturas eram capturadas de forma indiferenciada quer por células patológicas, quer por células saudáveis, surgiu a necessidade de desenvolver lipossomas com especificidade para determinados alvos terapêuticos.⁽²⁹⁾ Atualmente existem lipossomas que são considerados estratégias promissoras no transporte de fármacos: lipossomas catiónicos, no qual se cria uma forte afinidade entre a carga positiva dos lípidos do nanossistema com a carga negativa do material genético a transportar; imunolipossomas, que se baseiam na conjugação de anticorpos monoclonais à superfície do sistema; virossomas, em que se cria uma ligação entre um envelope viral e o lipossoma.^{(10) (29)} (Consultar Anexo I)

2.4 Dendrímeros

Apesar de os dendrímeros terem sido sintetizados pela primeira vez em 1978, sendo denominados como “moléculas-cascata”, o desenvolvimento desta classe de sistemas só ocorreu a partir de 1985 com a síntese dos conhecidos dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM), tendo hoje inúmeras aplicações na área do diagnóstico e da terapêutica.⁽³⁴⁾

Os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares de 3-10 nm altamente ramificadas que se formam a partir de um átomo central, como o nitrogénio.^{(35) (36)} De seguida, uma série de reações químicas ocorrem com a adição de carbono e de outros elementos, resultando em repetições de cadeias e ramificações que dão origem a camadas concêntricas radiais, sendo que cada ramificação possui uma disjunção binária.^{(10) (34) (36)} (Figura 8)

A superfície destas macromoléculas tridimensionais pode ser modificada pela introdução de grupos funcionais nos seus monómeros terminais, de modo a alterar as propriedades físico-químicas, como a rigidez, reatividade química e solubilidade.⁽³⁷⁾ Portanto, a diversidade de estruturas dendríticas depende da escolha do grupo de superfície e do tipo de ligandos que são utilizados. Por cada camada de unidades de ramificação, ou seja, por cada geração a mais no dendrímero, o número de grupos modificáveis à superfície duplica ou até triplica, enquanto o seu diâmetro apenas aumenta 1-2 nm.⁽³⁸⁾


 Figura 8 – Dendrímero de 4 gerações. ⁽²⁵⁾

A síntese dos dendrímeros é realizada passo-a-passo, através de unidades ramificadas de polímero, podendo ser efetuada por dois métodos diferentes: um método divergente e um método convergente. No primeiro caso, o dendrímero é construído a partir de um centro, através da incorporação sequencial de monómeros no núcleo. No segundo caso, as ramificações são sintetizadas em primeiro lugar e só posteriormente é que são todas ligadas a um núcleo central. Contudo, a síntese divergente é a preferencial, uma vez que gera produtos mais puros e apresenta maior rendimento. ^{(39) (40)} Assim sendo, os dendrímeros mais comuns são compostos por derivados de poliamidas (PAMAM), poliésteres e polietilenoglicóis, tendo em conta que os principais grupos cliváveis são as amidas, ésteres e carbamatos. ⁽⁴¹⁾ Através da escolha de diferentes polímeros, com diferentes grupos funcionais terminais, é possível controlar com precisão o tamanho do dendrímero, a forma, a dimensão, a polaridade, a flexibilidade e a solubilidade. ⁽³⁹⁾

Os dendrímeros, devido às inúmeras vantagens que apresentam, são excelentes candidatos ao transporte de fármacos, podendo o acoplamento ser feito de diferentes formas: o fármaco incorporado dentro da estrutura dendrítica, através de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogénio; os monómeros podem conter o fármaco, proporcionando um aumento exponencial do fármaco a cada subsequente geração que é adicionada; interações com a estrutura ramificada através de espaçadores; e o fármaco ligado diretamente à superfície do dendrímero, através de interações eletrostáticas e covalentes. ^{(10) (42) (43)} Muitas vezes, os dendrímeros são conjugados à superfície com PEG, de modo a criar uma camada hidrofílica ao redor do dendrímero hidrofóbico, formando a chamada “micela unimolecular” capaz de transportar fármacos hidrofóbicos no interior e fármacos hidrofílicos na camada superficial de PEG. ⁽⁴⁴⁾

O processo de desintegração de um dendrímero clivável, ou despolimerização, pode ocorrer de três formas: libertação do fármaco ou espécies químicas menores não ligadas

covalentemente ao dendrímero; clivagem de ligações covalentes consecutivas com remoção inicial de grupos funcionais da periferia, seguida da quebra das ramificações (ou parte delas) até ao núcleo; e um modo combinado em que a hidrólise de ligações covalentes da periferia é fundamental para a libertação das moléculas não ligadas covalentemente. ⁽⁴¹⁾ ⁽⁴²⁾ (Consultar Anexo II)

Os dendrímeros são sem dúvida sistemas de última geração com grande potencial para transportar fármacos e agentes de contraste, pelas inúmeras vantagens que apresentam: arquitetura altamente ramificada e regular; baixa polidispersividade, o que facilita a sua passagem através de barreiras biológicas, como a BHE; grande número de funcionalidades periféricas; capacidade de fazer múltiplas cópias de grupos de superfície para um processo de reconhecimento biológico; facilidade na preparação; pequeno tamanho, quando comparado com micelas, nanopartículas poliméricas e lipossomas; e capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾ No entanto, apresentam a mesma limitação que as outras partículas poliméricas, ou seja, a possibilidade de alguma toxicidade por parte dos polímeros utilizados. ⁽³⁴⁾

3. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS EM ALVOS NEUROLÓGICOS

3.1 Doença de Alzheimer

O Alzheimer é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns. É uma doença progressiva caracterizada pelo depósito da proteína β -amilóide no espaço existente entre os neurónios, formando placas senis. Por outro lado, há deposição da proteína Tau no interior dos neurónios, formando emaranhados neurofibrilares. Este quadro anátomo-patológico é responsável por uma demência e perda das funções cognitivas. ⁽⁴⁶⁾

l) Nanopartícula de PBCA revestida com Polissorbato 80 (Tween 80[®]) no transporte da Rivastigmina ⁽⁴⁷⁾

As nanopartículas de poli(n-butil-cianoacrilato) (PBCA) têm sido utilizadas no transporte de fármacos até ao cérebro com elevado grau de sucesso, enquanto que o seu revestimento com Tween 80[®] já mostrou ser vantajoso na passagem através da BHE. ⁽²⁷⁾

Estudos já realizados revelaram que as nanopartículas PBCA revestidas com Tween 80[®] são eficazes no transporte da rivastigmina até à BHE, sendo este fármaco um inibidor reversível de colinesterases usado no tratamento da doença de Alzheimer. Quando as

nanopartículas são administradas por via intravenosa, o Tween 80[®] promove uma adsorção das proteínas do plasma, especialmente a Apolipoproteína E (Apo E), à sua superfície. Este aspeto torna-se interessante ao perceber que as células endoteliais da BHE possuem recetores de LDL com afinidade para as Apo E, e portanto as nanopartículas com Apo E à superfície podem ser reconhecidas e interagir com os recetores LDL da BHE, sendo responsáveis pelo *uptake* da Rivastigmina no cérebro. ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁸⁾ É de notar que outros surfactantes podem servir de revestimento para as nanopartículas e inclusive promover igualmente a ligação de proteínas do plasma, no entanto parece que apenas o Tween 80[®] absorve preferencialmente as Apo E. ⁽⁴⁸⁾

II) Lipossoma PE-PEG conjugado com Ácido Fosfatídico e Anticorpo Monoclonal Ri7217 ⁽⁴⁹⁾

Os lipossomas PE-PEG (fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol) são sistemas constituídos por um tipo de fosfolípidos e PEG, que promovem um aumento do tempo de circulação destes sistemas na corrente sanguínea. Enquanto que o ácido fosfatídico é um lípido que demonstrou, em estudos já realizados, ter elevada afinidade para os agregados de proteína β -amilóide e ser capaz de proteger as células da toxicidade desses agregados *in vitro*. Como possível promotor de passagem na BHE, foi adicionado um anticorpo monoclonal Ri7217 contra os recetores de transferrina presentes no endotélio da BHE, tornando estes anticorpos ótimos candidatos para auxiliar os lipossomas a alcançar o cérebro.

Com esta formulação imunolipossómica, realizou-se um estudo em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas imortalizadas (Hcmec/D3) que expressavam os recetores de transferrina à superfície. O objetivo deste estudo foi avaliar o *uptake* celular dos imunolipossomas e também a sua permeabilidade através de um modelo de BHE *in vitro* feito com as mesmas células.

Os resultados revelaram que os anticorpos monoclonais Ri7217 ligaram-se eficazmente aos recetores da transferrina e os lipossomas conseguiram ultrapassar a BHE sem alterar a viabilidade celular e a integridade da monocamada. Por outro lado, a incorporação dos anticorpos nos lipossomas não modificou as propriedades de ligação do ácido fosfatídico, que manteve a sua afinidade e capacidade de ligação aos peptídeos β -amilóides. Comparações realizadas com outros estudos permitiram concluir que o *uptake* e a permeabilidade celular foram mais elevados na presença do anticorpo do que apenas no lipossoma contendo ácido fosfatídico.

Ao equacionar um futuro estudo *in vivo*, várias questões devem tentar ser esclarecidas, nomeadamente se a ligação destes imunolipossomas aos peptídeos β -amilóides será eficiente e específica; se esta formulação de lipossomas conjugados com ácido fosfatídico e anticorpos monoclonais Ri7217 será estável no cérebro onde existem concentrações elevadas de β -amilóide; e se a ligação destes imunolipossomas poderá facilitar a eliminação das placas β -amilóides e promover a sua degradação nas células. ⁽⁴⁹⁾

3.2 Glioblastoma

Os gliomas são tumores cerebrais primários originados em células da glia, podendo ser astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas ou ependimomas. O Glioblastoma multiforme (GBM) é um astrocitoma de grau IV, sendo responsável por 70% de todos os gliomas malignos. ⁽⁵⁰⁾ As características fisiológicas de um tumor sólido, como o glioblastoma, podem ser usadas em benefício da terapêutica utilizando nanopartículas: o facto de haver coágulos e depósitos de fibrina dentro e à volta do tumor, bem como a formação de neovasos que apresentem fenestrações de tamanho entre 100-780 nm, permitindo às nanopartículas entrarem nesses neovasos do tumor pelo chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR). ⁽⁵¹⁾

l) Micelas DSPE-PEG(2000) conjugadas com o pentapeptídeo CREKA e o fluoróforo Cy7 ⁽⁵⁰⁾

As micelas DSPE-PEG(2000) [(diesteril-fosfatidiletanolamina)-polietilenoglicol (2000)] são constituídas por um tipo de fosfolípidos e PEG, que promovem um aumento do tempo de circulação destes nanosistemas na corrente sanguínea, enquanto que o Cy7 é um fluoróforo utilizado para visualizar as micelas *in vivo*. O pentapeptídeo CREKA (cisteína-arginina-ácido glutâmico-lisina-alanina) é um peptídeo que apresenta bastante afinidade para os coágulos de fibrina, segundo estudos previamente realizados noutros tipos de tumores. Assim, este pentapeptídeo é usado nesta formulação para testar a sua capacidade de localizar e de se ligar à fibrina do glioblastoma.

Num estudo primordial do glioblastoma, procedeu-se da seguinte forma: as micelas DSPE-PEG(2000) conjugadas com CREKA e Cy7 foram administradas por via intravenosa em modelos de ratos com glioblastoma GL261. Após uma hora de circulação na corrente sanguínea, a localização da micela no tumor tornou-se visível e a sua acumulação aumentou com o tempo. Confirmou-se assim que as micelas conseguem alcançar passivamente o

glioma pelo efeito EPR e que o pentapeptídeo CREKA pode aumentar o tempo de retenção no tumor devido à sua afinidade. (Consultar Anexo III) Para além disso, foi possível concluir que este sistema tem potencial para fornecer o máximo de carga útil dentro de três horas após a sua administração e é mantido durante pelo menos vinte e quatro horas. Após sete dias da administração, verificou-se que estas micelas foram completamente eliminadas do cérebro e da circulação sanguínea, tendo apenas sido localizadas no fígado. Este facto permitiu concluir que a administração intravenosa destas micelas não contribui para a sua acumulação a longo prazo no cérebro, mas sim para alcançar de forma seletiva e rápida o glioma.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram ser bastante promissores numa futura terapêutica para o glioblastoma, podendo tornar a quimioterapia altamente eficiente no tratamento de tumores cerebrais.⁽⁵⁰⁾

3.3 Paralisia Cerebral

A Paralisia Cerebral refere-se a um grupo de distúrbios no desenvolvimento do controlo motor e da postura, como resultado de uma lesão não progressiva aquando do desenvolvimento do sistema nervoso central. Portanto trata-se de uma doença que afeta maioritariamente os bebés, podendo surgir no período pré ou pós natal.⁽³⁵⁾

l) Dendrímeros PAMAM-G4OH com N-acetilcisteína (NAC) à superfície⁽³⁵⁾

Os dendrímeros de PAMAM são talvez o tipo de dendrímeros mais estudados nas patologias cerebrais, uma vez que apresentam uma capacidade fantástica de se difundirem através do tecido do SNC *in vivo* e de penetrarem nos neurónios vivos.⁽¹⁰⁾ A N-acetilcisteína (NAC) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo um ligando estratégico na medida em que favorece uma libertação neuronal intracelular pois entra nas células pelo mesmo mecanismo que a glutathione, que é um importante antioxidante que confere neuroproteção às células cerebrais.

Num estudo realizado, procedeu-se da seguinte forma: administraram-se endotoxinas, por via intra-uterina, a coelhas em período de gestação, por forma a induzir uma paralisia cerebral nos coelhos filhos. Desta forma, os filhos nasceram com a doença e neles foi administrado, por via intravenosa, dendrímeros PAMAM-G4-OH com NAC à superfície. Verificou-se que estes sistemas conseguiram ultrapassar a BHE e localizaram-se seletivamente em células associadas à neuroinflamação, como a microglia e os astrócitos,

através da difusão pelo parênquima cerebral e endocitose nessas células. Para além disto, a localização dos dendrímeros em células saudáveis e o seu *uptake* por parte do cérebro foram mínimos.

Quatro dias após a injeção dos dendrímeros, verificaram-se resultados neurocomportamentais positivos e uma melhoria na função motora dos coelhos recém-nascidos: houve uma diminuição da resposta inflamatória, uma diminuição do número de microglia e astrócitos ativados, bem como uma melhoria das lesões nervosas com o aumento da mielinação. (Consultar Anexo IV)

Os resultados deste estudo comprovaram que é possível obter uma estratégia de tratamento para atenuar lesões cerebrais ocorridas no período pré-natal. Devido à capacidade que os dendrímeros PAMAM-G4OH (4^a geração) apresentaram em alcançar os neurónios e células ativadas da glia de coelhos, fez crescer a hipótese de existir um potencial terapêutico nestes nanovetores, oferecendo a oportunidade para a transposição clínica no tratamento de doenças inflamatórias neurológicas em seres humanos.⁽³⁵⁾

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A incidência de doenças neurológicas, como o Alzheimer, o Parkinson e o glioblastoma, está a aumentar. No entanto, a impermeabilidade da BHE continua a ser uma limitação no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e terapêutica para alvos neurológicos, uma vez que esta barreira exerce uma ação protetora no cérebro contra moléculas externas.

A necessidade de desenvolver novas estratégias para melhorar o transporte de fármacos até ao cérebro tem sido um desafio constante e a nanotecnologia está a contribuir significativamente para o sucesso das investigações realizadas na neurociência. Tanto as micelas e as nanopartículas poliméricas, como os lipossomas e os dendrímeros, são dos nanosistemas mais estudados nesta área e que começam a demonstrar, em ensaios clínicos e não clínicos, que podem ser uma mais-valia como *Drug Delivery Systems* (DDS) no SNC. Em geral, estes nanovetores são biodegradáveis e sem imunogenicidade, aumentam a solubilidade dos fármacos, para além do seu reduzido tamanho, que lhes permite interagir a um nível molecular com os sistemas biológicos.

Apesar destes nanosistemas apresentarem estabilidade na corrente sanguínea, de protegerem o fármaco da degradação enzimática e de promoverem uma libertação prolongada, que são todos pré-requisitos fundamentais na nanomedicina, estes já não são

considerados requisitos suficientes para o desenvolvimento de novas terapêuticas eficazes. Assim, atribuir especificidade aos nanovetores e direcioná-los para determinadas células patológicas constitui o mais atual desafio, face às dificuldades na compreensão de alguns mecanismos da nanoquímica e acima de tudo dificuldades na caracterização dos nanosistemas do ponto de vista tecnológico e fisiológico.

O número de ensaios clínicos e não clínicos com nanosistemas para alvos neurológicos cresceu na última década e alguns dos resultados obtidos são bastante promissores, verificando-se uma importante percentagem de localização dos sistemas estudados no cérebro relativamente à dose administrada, o que demonstra que estes são potenciais transportadores de fármacos e de outras moléculas para o cérebro.⁽⁸⁾

Já existem igualmente nanosistemas patenteados como DDS para o cérebro. Estes dados são indicadores positivos que revelam a progressão dos estudos nas áreas da neurociência e da nanotecnologia, e demonstram que existem boas perspectivas num futuro próximo relativamente ao diagnóstico e à terapêutica nas doenças neurológicas. No entanto, torna-se necessário a realização de mais estudos nesta área, uma vez que os mecanismos moleculares e celulares envolvidos quer na passagem dos nanosistemas através da BHE, quer na sua interação com os tecidos neurológicos alvo não estão totalmente conhecidos e compreendidos. Por outro lado, o delineamento de estudos pré-clínicos bem controlados torna-se um desafio, podendo contribuir com grande impacto para a evolução da nanotecnologia na neurociência clínica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NATH, D.; BANERJEE, P. - **Green nanotechnology :A new hope for medical biology**. Environmental Toxicology and Pharmacology. 36 (2013) 997-1014.
2. OCHEKPE, N.A.; OLORUNFEMI, P.O.; NGWULUKA, N.C. - **Nanotechnology and Drug Delivery Part I: Background and Applications**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8 (2009) 265-274.
3. CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D.M. - **Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer**. Clinical Cancer Research. 14 (2008) 1310-1316.
4. MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E. - **Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology**. Annals of the New York Academy of Sciences. 1184 (2010) 154-172.
5. KREUTER, J. - **Nanoparticles: a historical perspective**. International Journal of Pharmaceutics. 331 (2007) 1-10.
6. RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. - **Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets**. International Journal of Nanomedicine. 8 (2013) 951-960.
7. NEHA, B.; GANESH, B.; PREETI, K. - **Drug Delivery to the Brain using Polymeric Nanoparticles: A Review**. International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences. 2 (2013) 107-132.
8. TOSI, G.; RUOZI, B.; BELLETTI, D. - **Nanomedicine: the future for advancing medicine and neuroscience**. Nanomedicine. 7 (2012) 1113-1116.
9. RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. - **Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs**. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29 (2006) 1790-1798.
10. MASSERINI, M. - **Nanoparticles for Brain Drug Delivery**. ISRN Biochemistry. 2013 (2013).
11. VERMA, R.K.; GARG, S. - **Current Status of Drug Delivery Technologies and Future Directions**. Pharmaceutical Technology On-Line. 25 (2001) 1-14.
12. TORCHILIN, V. - **Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 71 (2009) 431-444.
13. MORSHED, R. A.; CHENG, Y.; AUFFINGER, B.; WEGSCHEID, M.L.; LESNIAK, M.S. - **The potential of polymeric micelles in the context of glioblastoma therapy**. Frontiers in Pharmacology. 4 (2013) 157.
14. HUSSEINI, G. A.; PITT, W.G. - **Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews. 60 (2008) 1137-1152.
15. MOURYA, V.K.; INAMDAR, N.; NAWALE, R.B.; KULTHE, S.S. - **Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications**. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 45 (2010) 128-138.
16. ZHANG, N.; WARDWELL, P.R.; BADER, R.A. - **Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery**. Pharmaceutics. 5 (2013) 329-352.
17. PROVENZALE, J.M.; SILVA, G.A. - **Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy**. American Journal of Neuroradiology. 30 (2009) 1293-1301.

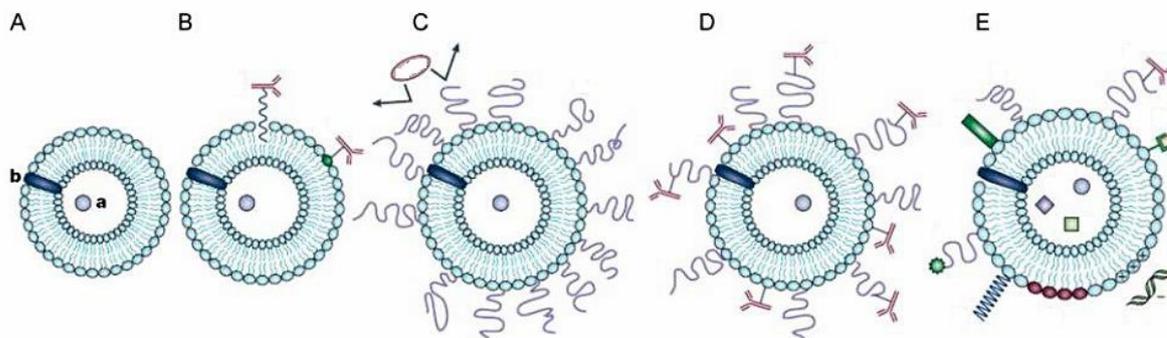
18. FRANCIS, M.F.; CRISTEA, M.; WINNIK, F.M. - **Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how.** Pure and Applied Chemistry. 76 (2004) 1321-1335.
19. ANDRADE, F. *et al.* - **Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery.** International Journal of Carbohydrate Chemistry. 2011 (2011).
20. SINGH, A.V.; KHARE, M.; GADE, W.N.; ZAMBONI, P. - **Theranostic Implications of Nanotechnology in Multiple Sclerosis: A Future Perspective.** Autoimmune Diseases. 2012 (2012).
21. SUTTON, D.; NASONGKLA, N.; BLANCO, E.; GAO, J. - **Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery.** Pharmaceutical Research. 24 (2007) 1029-1046.
22. SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.U.; FREITAS, L.D.; POHLMANN, A.R. - **Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration.** Química Nova. 26 (2003) 726-737.
23. STEICHEN, S.D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N.A. - **A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics.** European Journal of Pharmaceutical Sciences. 48 (2013) 416-427.
24. BLOUZA, I.L. *et al.* - **Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use,** International Journal of Pharmaceutics. 325 (2006) 124-131.
25. BEI, D.; MENG, J.; YOUAN, B.B. - **Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises.** Nanomedicine. 5 (2010) 1385-1399.
26. RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.; PRÉAT, V. - **Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach.** Journal of Controlled Release, 116 (2006) 1-27.
27. DIKPATI, A. *et al.* - **Targeted Drug Delivery to CNS using Nanoparticles.** Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences. 2 (2012) 179-191.
28. QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. - **Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique.** Pharmaceutical Research. 15 (1998) 1056-1062.
29. SPUCH, C.; NAVARRO, C. - **Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease).** Journal of Drug Delivery. 2011 (2011) 1-12.
30. SHARMA, A.; SHARMA, U.S. - **Liposome in drug delivery: progress and limitations.** International Journal of Pharmaceutics. 154 (1997) 123-140.
31. CHAPMAN, M.; PASCU, S.I. - **Nanomedicines Design: Approaches towards the Imaging and Therapy of Brain Tumours.** Journal of Nanomedicine and Nanotechnology. 54 (2012).
32. BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. - **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 43 (2007) 167-179.
33. VEMURI, S.; RHODES, C.T. - **Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review.** Pharmaceutica Acta Helvetiae, 70 (1995) 95-111.

34. BOAS, U.; CHRISTERSEN, J.B.; HEEGAARD, P.M.H. - **Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools.** Dendrimers: design, synthesis, and chemical properties. (2006).
35. BALAKRISHNAN, B.; NANCE, E.; JOHNSTON, M.V.; KANNAN, R.; KANNAN, S. - **Nanomedicine in cerebral palsy.** International Journal of Nanomedicine. 8 (2013) 4183-4195.
36. NAGA ANUSHA, P.; SIDDIQUI, A. - **Nanomaterial Platform for Drug Delivery.** Journal of Nanomedicine and Nanotechnology. 2 (2011).
37. NEWKOME, G.R.; KOTTA, K.K.; MOORFIELD, C.N. - **Design, Synthesis, and Characterization of Conifer-Shaped Dendritic Architectures.** Chemistry - A European Journal. 12 (2006) 3726-3734.
38. SARIN, H. *et al.* - **Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells.** Journal of Translation Medicine. 6 (2008).
39. LANGEREIS, S. *et al.* - **Dendrimers and magnetic resonance imaging.** New Journal of Chemistry. 31 (2007) 1152-1160.
40. ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. - **Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical application.** Drug discovery Today. 6 (2001) 427-436.
41. GINGRAS, M.; RAIMUNDO, J.M.; CHABRE, Y.M. - **Cleavable Dendrimers.** Angewandte Chemie International Edition. 46 (2007) 1010-1017.
42. D'EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. - **Dendrimer-drug interactions.** Advanced Drug Delivery Reviews. 57, (2005) 2147-2162.
43. LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. - **Designing dendrimers for drug delivery.** Pharmaceutical Science and Technology Today. 2 (1999) 393-401.
44. CRAMPTON, H.; SIMANEK, E.E. - **Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers.** Polymer International. 56 (2007) 489-496.
45. SINGH, S.B. - **Novel Approaches for Brain Drug Delivery System-Review.** International Journal of Pharma Research and Review. 2 (2013) 36-44.
46. AKULA, K.K. - **Revisiting Neuroscience with Nanomedicine, a Renaissance in Remedy.** Innovations in Pharmaceutical and Pharmacotherapy. 1 (2013) 1-60.
47. ALYAUDDIN, R. *et al.* - **Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier.** International Journal of Nanomedicine. 9 (2014) 795-811.
48. BEGLEY, D.J. - **Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities.** Pharmacology and Therapeutics. 104 (2004) 29-45.
49. SALVATI, E. *et al.* - **Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- β peptide: the chemical design affects the permeability across an in vitro model.** International Journal of Nanomedicine. 8 (2013) 1749-1758.
50. CHUNG, E.J. *et al.* - **Fibrin-binding, peptide amphiphile micelles for targeting glioblastoma.** Biomaterials. 35 (2014) 1249-1256.
51. OLIVEIRA, L.C. *et al.* - **Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura.** Revista Brasileira de Cancerologia. 58 (2012) 695-701.

52. SILVA, G.A. - **Nanotechnology approaches for drug and small molecule delivery across the blood brain barrier.** *Surgical Neurology.* 67 (2007) 113-116.

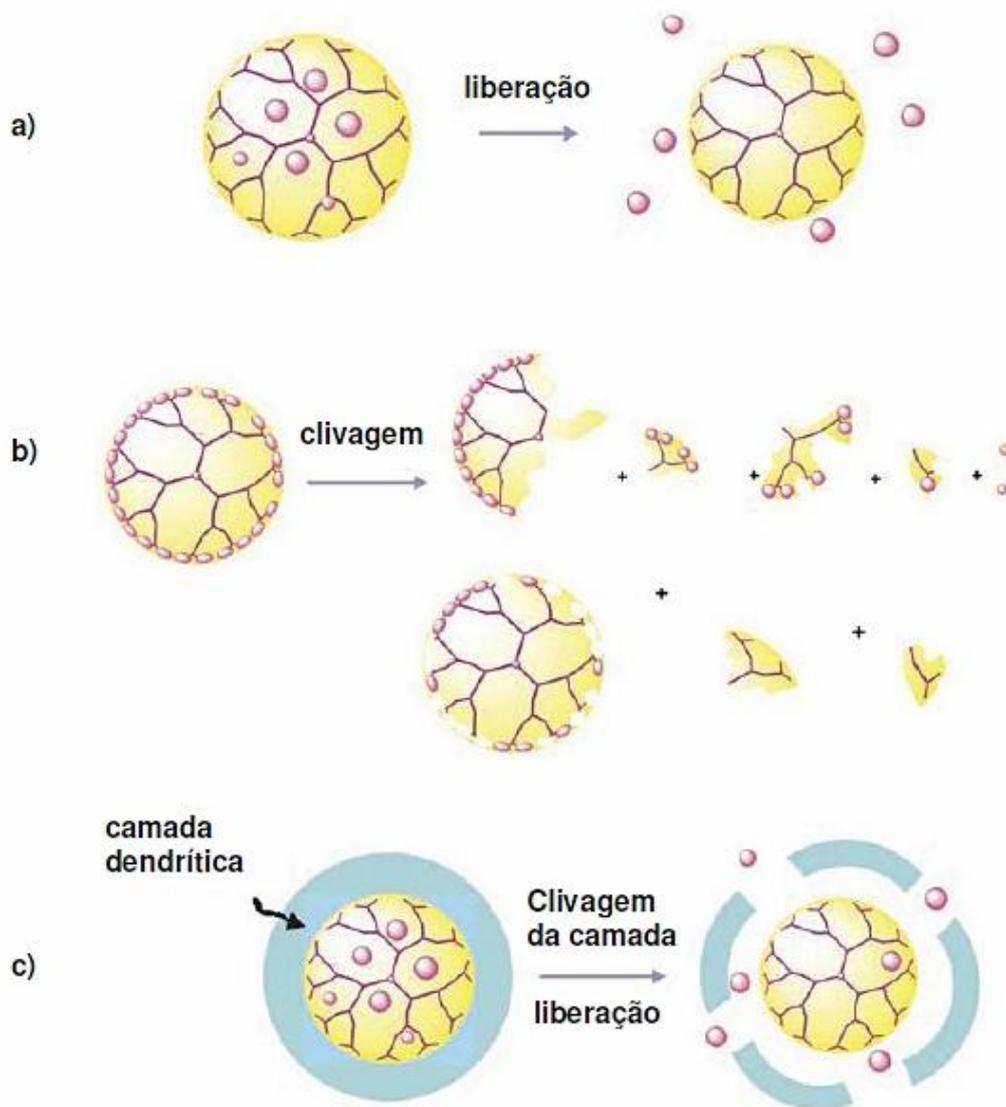
ANEXOS

Anexo I



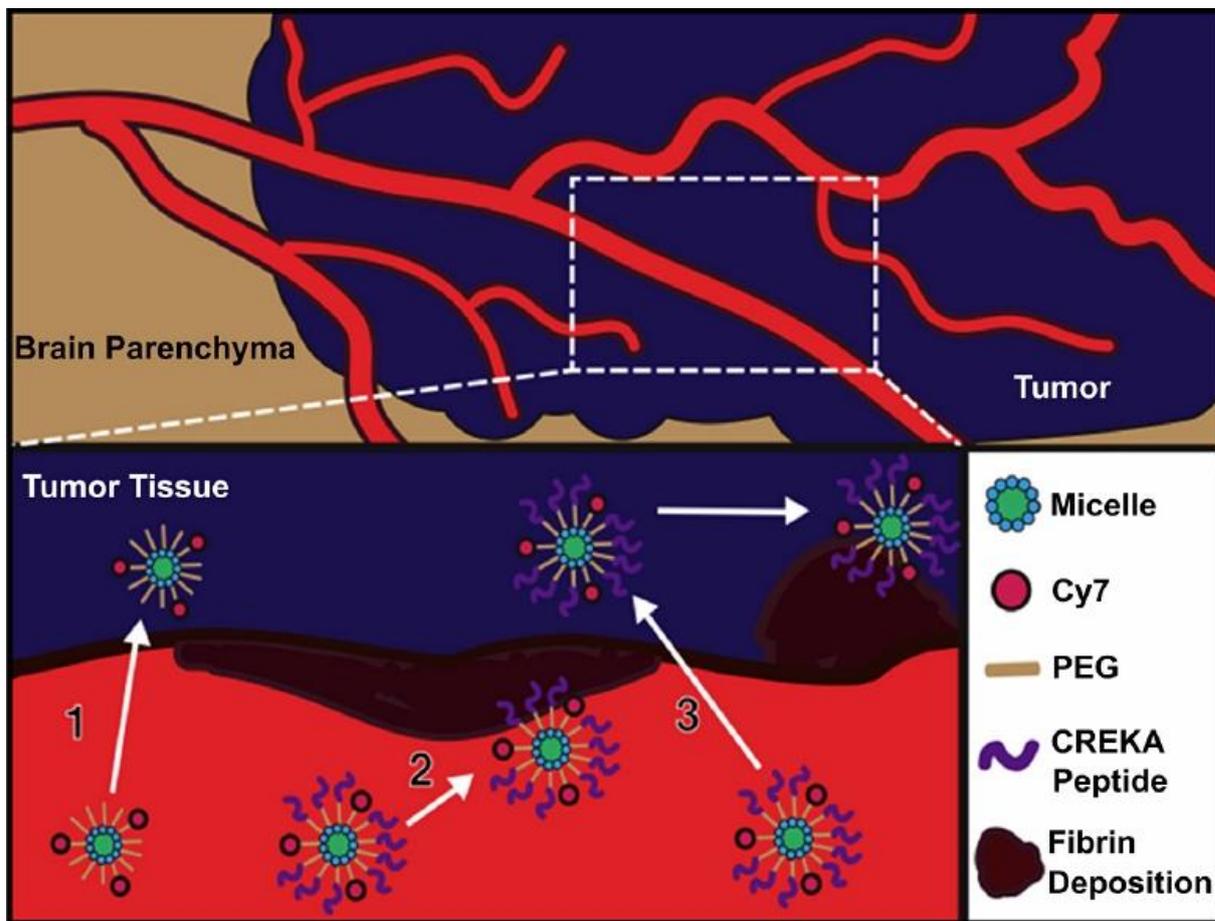
Evolução dos lipossomas como DDS: (A) Lipossoma fosfolipídico convencional com fármaco hidrofílico incorporado no seu interior aquoso e fármaco hidrofóbico incorporado na membrana lipossomal; (B) Immunolipossoma com anticorpo ligado covalentemente aos fosfolípidos da membrana ou ligado hidrofobicamente na membrana lipossomal após modificações com um grupo hidrofóbico; (C) Lipossoma com um polímero protetor, como PEG, que promove um aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea e protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas opsonizantes; (D) Immunolipossoma de longa circulação, simultaneamente, com polímero protetor e anticorpo, em que este último pode ser ligado à superfície do lipossoma ou, de preferência, à extremidade distal da cadeia polimérica inserida. (E) Nova geração de lipossomas, em que a superfície pode ser modificada (separadamente ou simultaneamente) de diferentes formas: adição de um polímero protetor (PEG) ou adição de um polímero protetor juntamente com um ligando específico para determinado alvo; incorporação de um marcador de diagnóstico; incorporação de lípidos com carga positiva que permitem a complexação com o DNA, que apresenta carga negativa; incorporação de lípidos sensíveis a estímulos, como temperatura e pH; adição de polímeros que respondem a estímulos; adição de peptídeos que favorecem a penetração nas células; incorporação de componentes virais. ⁽¹²⁾

Anexo II



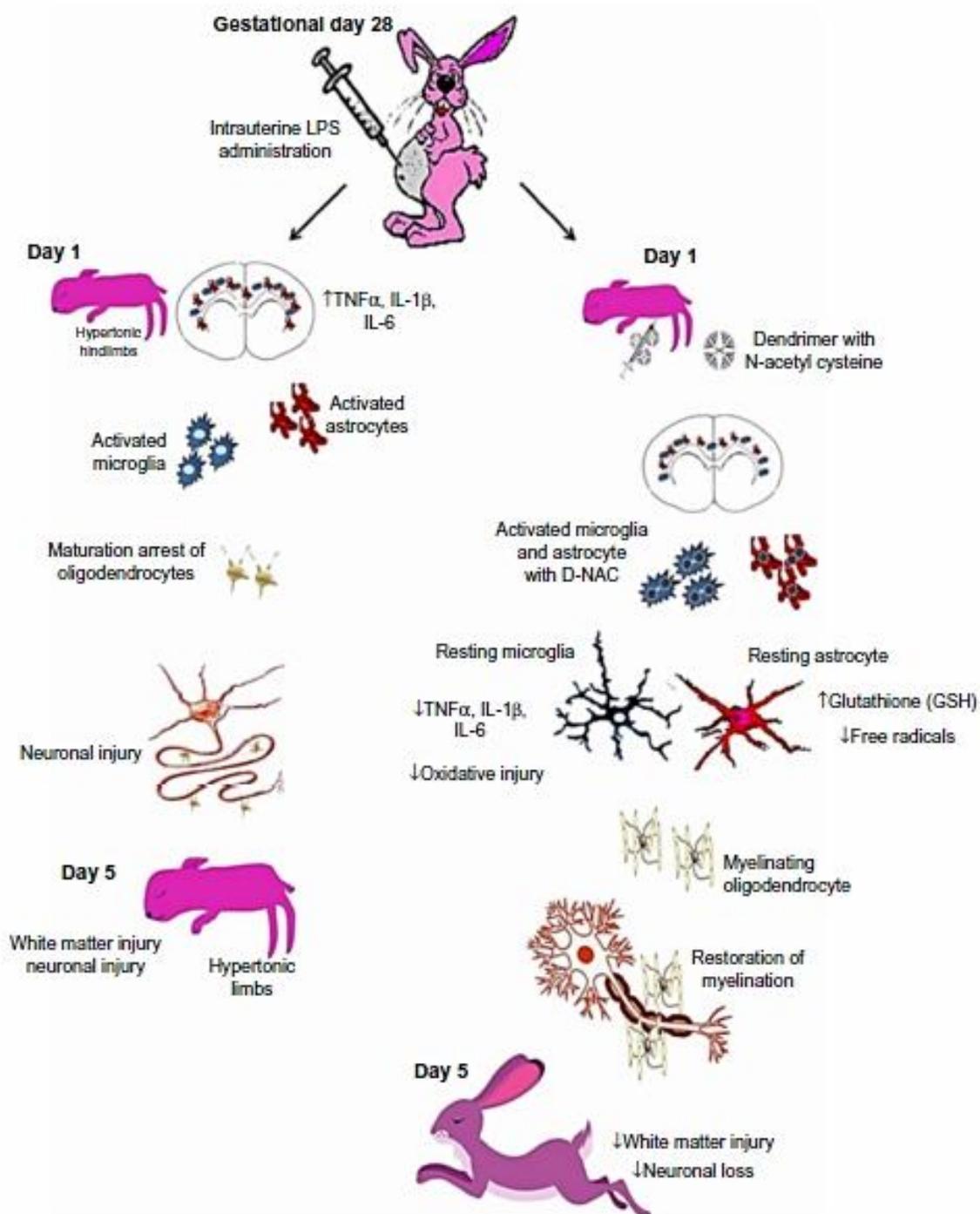
Esquemática dos principais modos de desintegração dos dendrímeros: (A) Clivagem supramolecular; (B) Clivagem covalente; (C) Combinação da clivagem covalente e da clivagem supramolecular. ⁽⁴¹⁾

ANEXO III



Esquema representativo das micelas DSPE-PEG conjugadas com CREKA e Cy7 a alcançar o glioma através do efeito EPR e da sua ligação ativa à fibrina.⁽⁵⁰⁾

Anexo IV



Representação esquemática do tratamento com dendrímeros PAMAM-G4-OH com NAC à superfície, em coelhos recém-nascidos com paralisia cerebral. ⁽³⁵⁾