



UAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias



*VIIH – Tratamento, profilaxia e novas
estratégias no âmbito da nanotecnologia*

Joana Pereira Aires Gomes



Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Dr. Ana Grenha

2014



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

VIH – Tratamento, profilaxia e novas estratégias no âmbito da nanotecnologia

Joana Pereira Aires Gomes

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Dr. Ana Grenha

2014

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © Joana Pereira Aires Gomes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Living on the edge

Agradecimentos

Há na beleza do destino a maravilha da viagem.

À presença e apoio incondicional da minha família;

Às lições de vida da Feminis Ferventis, Tuna Académica Feminina da UAlg;

Às grandes amigas, como a da Sininho e da Marina;

Ao companheirismo dos meus colegas de turma;

Aos momentos passados na Academia da Universidade do Algarve;

À cidade de Faro,

Obrigada por fazerem parte da pessoa que hoje sou.

À Professora Doutora Ana Grenha, pela oportunidade de fazer parte da sua equipa de investigação e, acima de tudo, pela infinita paciência nas correções;

À Sara, Susana e Marita, por todo o apoio prestado no decorrer dos procedimentos laboratoriais,

Sem vós esta monografia não se teria realizado.

Índice

1	Metodologia	12
2	Introdução	13
3	Imunidade.....	17
3.1	Imunidade Inata.....	17
3.1.1	Fatores Mecânicos.....	18
3.1.2	Mediadores Químicos.....	18
3.1.3	Células.....	19
3.2	Imunidade Adaptativa	19
3.2.1	Origem e maturação dos Linfócitos.....	20
3.2.2	Ativação dos Linfócitos	21
3.2.3	Co Estimulação	23
3.2.4	Proliferação de Linfócitos	24
3.2.5	Inibição de Linfócitos.....	24
3.2.6	Imunidade Mediada por Células	25
4	A Infecção por VIH.....	27
4.1	Estrutura do vírus.....	27
4.2	Mecanismo de Infecção.....	28
4.3	Da Infecção por VIH à SIDA.....	29
5	Soluções Terapêuticas	31
6	Soluções Profiláticas	34
7	A nanotecnologia no tratamento e profilaxia do VIH-1	36
7.1	Nanomateriais com interesse antirretroviral	38
7.2	Barreiras biológicas – o desafio	39

7.3	Novas abordagens terapêuticas	40
7.3.1	Abordagens em investigação.....	44
7.4	Novas abordagens profiláticas.....	48
8	Conclusão.....	51
9	Referências Bibliográficas.....	53

Índice de Figuras

Figura 2.1: Processamento de antigénios. ¹	22
Figura 2.2: Processo de Co Estimulação. ¹	23
Figura 2.3: Estimulação e ações das células T. ¹	26
Figura 3.1: Estrutura do VIH. ⁸⁵	27
Figura 3.2: Replicação do VIH-1. ¹³	29
Figura 4.1: Fármacos anti retrovirais existentes em Portugal. ¹⁶	32
Figura 6.1: Exemplos de nanomateriais (adaptado). ⁶	39
Figura 6.2: DermaPrep®. ⁷²	46
Figura 6.3: Administração do DermaVir (adaptado). ⁸⁷	46
Figura 6.4: Características do modelo ideal para a profilaxia do VIH (adaptado). ⁸⁴	48
Figura 6.5: Estrutura química do SPL7013. ⁷⁸	49

Índice de Gráficos

Gráfico 1.1: Prevalência (%) do VIH entre 15 e 49 anos na Europa. ²	13
Gráfico 1.2: Mortes nos casos de infeção por VIH e SIDA – Distribuição, segundo o ano de morte, dos óbitos notificados e dos óbitos registados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE). ³	15

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Casos de infeção por VIH, distribuição por ano de diagnóstico e ano de notificação. ³	14
Tabela 1.2: Casos de VIH diagnosticados em Portugal no ano 2012, segundo a categoria de transmissão e o estágio clínico. ³	15
Tabela 6.1: Potenciais benefícios da aplicação na nanotecnologia à terapêutica da infeção por VIH (adaptado). ⁶	37
Tabela 6.2: Tipos de nanomateriais utilizados na terapêutica do VIH-1 (adaptado). ⁸⁶ .	38
Tabela 6.3: Propriedades fisicoquímicas dos sistemas nanométricos e implicações em sistemas biológicos.	42

Resumo

Este trabalho pretende abordar a aplicação da nanotecnologia no tratamento e profilaxia da infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH).

A infeção por VIH tem um impacto muito significativo a nível mundial e, até à data, não existe cura para esta patologia. As terapêuticas atualmente existentes apenas procuram suprimir a replicação viral durante o maior período de tempo possível e, dados os níveis de toxicidade que apresentam, o início da terapêutica implica uma cuidada avaliação do risco/benefício associado. Cumulativamente, a toxicidade destes fármacos dificulta a adesão à terapêutica, fator que contribui para um maior desenvolvimento de resistência viral, assim como existem inúmeras interações descritas entre os fármacos anti retrovirais e outros que sejam administrados em terapêutica concomitante.

Nos últimos anos surgiu um grande interesse na aplicação da nanotecnologia à terapêutica antirretroviral, dado que permite encapsular fármacos e dotá-los de maior seletividade para os seus alvos terapêuticos, regulando e otimizando a sua biodisponibilidade. Assim, poderá fazer-se a administração de substâncias até agora impossíveis de administrar como, os ácidos nucleicos.

Desta forma, a toxicidade da terapêutica seria drasticamente reduzida, assim como a probabilidade de interação com outros fármacos, o que resultaria numa maior e mais eficaz adesão por parte do doente. As inovações que a nanotecnologia permite incrementar nesta área poderão contribuir para erradicar efetivamente a carga viral, objetivo que até hoje ainda não foi atingido.

Palavras-Chave

Carga viral, nanotecnologia, SIDA, terapêutica antirretroviral, VIH

Abstract

This study addresses the applicability of nanotechnology in VIH's treatments and prophylaxis.

The VIH infections has an important role at a worldwide level and there's no cure for this pathology. The existing therapeutics seek to suppress the viral replication as long as possible and, due to its toxicity, the beginning of the treatment needs an evaluation of its risk/benefit ratio. Also, the toxicity is a barrier for the adherence, which contributes for a higher development of viral resistance, and there's a lot of interactions described with concomitant therapeutics.

In recent years, a great interest has arisen in the applications of nanotechnology for anti-retroviral therapy, because it allows drugs' encapsulation that increases selectivity for its active sites, regulating and optimizing its bioavailability. Nanotechnology also allows the delivery of anti-VIH agents which are currently difficult to deliver e.g., nucleic acids.

This strategy would reduce toxicity, as well as drug interaction, resulting in an efficient adherence. This innovations that nanotechnology may input in this area might eradicate viral reservoirs, which that hasn't been done yet.

Keywords

AIDS, anti-retroviral therapy, nanotechnology, VIH, viral load.

1 Metodologia

Este trabalho foi realizado com base numa pesquisa efetuada entre Agosto de 2013 e Agosto de 2014, cujas bases de dados foram o PubMed e B-on. Entre as palavras chave utilizadas encontram-se:

- HIV
- Nanoparticle
- Chitosan
- Prophylaxy
- Therapeutic

2 Introdução

O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é o agente causal do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), uma doença considerada grave e que implica risco de vida. O primeiro relato de SIDA ocorreu em 1981, nos Estados Unidos. ¹Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2011 existiam 34 milhões de pessoas infetadas com o VIH, em todo o mundo. Nesse ano, 2.5 milhões de pessoas foram infetadas com o vírus e ocorreram 1.7 milhões de mortes devidas à SIDA. No contexto Europeu, Portugal, a par da Letónia, é o terceiro país com maior taxa de prevalência de VIH para a faixa etária entre os 15 e os 49 anos, estando em primeiro lugar a Estónia e em segundo a Ucrânia (Gráfico 1.1). ²

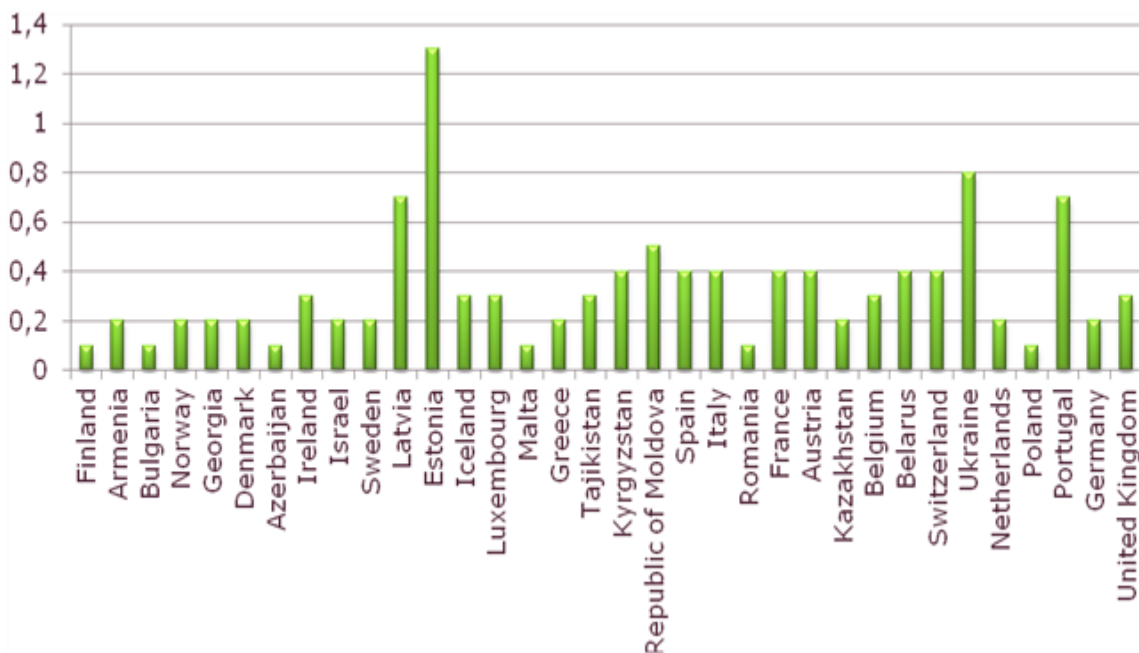


Gráfico 2.1: Prevalência (%) do VIH entre 15 e 49 anos na Europa. ²

Tabela 2.1: Casos de infeção por VIH, distribuição por ano de diagnóstico e ano de notificação. ³

Ano	Casos por ano de DIAGNÓSTICO	Casos por ano de NOTIFICAÇÃO*
1983	3	0
1984	6	0
1985	42	21
1986	78	40
1987	157	63
1988	260	157
1989	372	242
1990	523	374
1991	661	428
1992	942	599
1993	1 046	704
1994	1 312	986
1995	1 648	1 138
1996	2 128	1 314
1997	2 438	1 541
1998	2 647	1 752
1999	2 789	2 376
2000	2 795	3 674
2001	2 475	2 305
2002	2 393	2 462
2003	2 220	2 188
2004	2 147	2 585
2005	1 997	2 585
2006	2 046	2 142
2007	1 983	2 634
2008	1 983	2 287
2009	1 787	2 220
2010	1 605	2 316
2011	1 321	1 822
2012	776	1 625
Não referido	0	0
TOTAL	42 580	42 580

* DATA DE NOTIFICAÇÃO – data que o clínico inscreve na folha de notificação do caso sendo diferente da data de receção.

Em Portugal, o número de casos de VIH atingiu o número máximo no ano 2000, sendo que desde então o número tem vindo a decrescer, ainda que a um ritmo lento (Tabela 1.1).

Em 2005 tornou-se obrigatória a notificação de casos de infeção, pelo que nos anos subsequentes foram notificados casos que já tinham sido diagnosticados em anos anteriores.³

Dos casos diagnosticados em 2012, os maiores veículos de transmissão foram as relações heterossexuais (490 casos) e homo ou bissexuais (187 casos). Verificou-se também que o número de casos no estágio clínico mais avançado, evidenciando já SIDA, é muito significativo (247 casos) (Tabela 1.2).

Relativamente à análise da distribuição por sexo, esta revela que 549 (70,7%) são indivíduos do sexo masculino, pelo que a razão homem/mulher é de 2.4.³

O número de mortes causadas pelo VIH e SIDA é bastante significativo no panorama nacional, 1996 foi o ano que mais óbitos registou, sendo que desde então se tem verificado uma tendência decrescente. O número de óbitos por VIH e SIDA notificado ao

Instituto Nacional de Saúde (INSA) é bastante inferior ao valor registado pelo Instituto Nacional de Estatística, pelo que avaliando pelos dados do INE, o dado mais recente (2011) indica cerca de 600 óbitos (Gráfico 1.2).³

Tabela 2.2: Casos de VIH diagnosticados em Portugal no ano 2012, segundo a categoria de transmissão e o estágio clínico. ³

Categoria de transmissão	Estadio clínico			Total
	Portador Assintomático (PA)	Sintomático não-SIDA	SIDA	
Heterossexual	238	89	163	490
Toxicodependente	23	18	37	78
Homo ou bissexual	118	30	39	187
Homo/toxicodependente	1	0	0	1
Transfusionado	*1	0	0	*1
Mãe/filho	3	1	1	5
Não referida	7	0	7	14
Total	391	138	247	776

Nota: * Transusão ocorrida fora de Portugal.

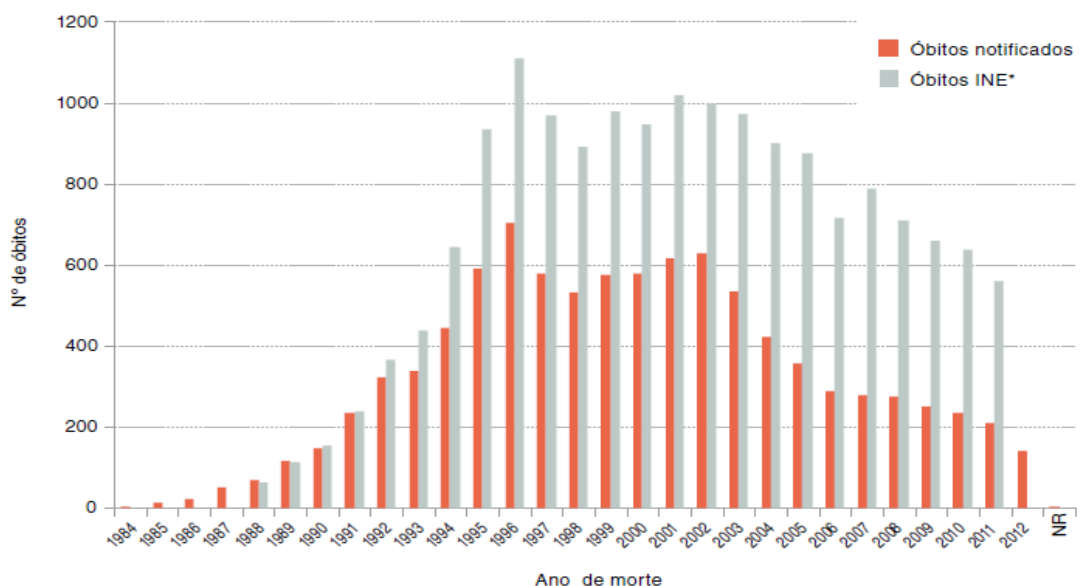


Gráfico 2.2: Mortes nos casos de infeção por VIH e SIDA – Distribuição, segundo o ano de morte, dos óbitos notificados e dos óbitos registados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE).³

Esta é portanto uma temática de relevo para a saúde pública nacional e mundial, que merece uma especial atenção pois, até à data, não existe cura para a infeção por VIH.

No que respeita às soluções terapêuticas atualmente existentes, estas baseiam-se em regimes de fármacos anti retrovirais, os quais têm inúmeros efeitos secundários, assim como terapêuticas concomitantes para tratar as infeções oportunistas que surgem devido ao facto do sistema imunitário se encontrar deprimido.⁴ A profilaxia também pode fazer-se com recurso a fármacos anti retrovirais, contudo os seus possíveis efeitos secundários constituem uma barreira na adesão à terapêutica, além de que esta opção é apenas aplicável a pessoas que possam já ter contactado com o vírus, correndo um elevado risco de infeção por VIH.⁴ Nos restantes casos, as estratégias profiláticas existentes procuram evitar o contato de indivíduos saudáveis com os fluidos orgânicos (sangue, esperma ou secreções vaginais) de indivíduos infetados, através do uso de preservativo e evitando a troca de seringas. As ações que visam informar e educar para o tema constituem também uma forma de profilaxia, ainda que indireta, pois visam sensibilizar a população para o perigo dos comportamentos de risco na transmissão do VIH, entre outros aspetos relacionados.⁵

As soluções terapêuticas atualmente existentes apresentam, a par da toxicidade e interações com a terapêutica concomitante, baixos índices de alcance dos locais de ação em causa com conseqüente diminuição da eficácia terapêutica.⁶ Muita investigação tem vindo a ser desenvolvida nesta área, no sentido de encontrar novas soluções terapêuticas que permitam aumentar a concentração dos princípios ativos anti retrovirais nos seus locais de ação no caso duma infeção já instalada e que constituam uma barreira à entrada do VIH no organismo, no caso de profilaxia relativamente a novas exposições ao vírus.⁶

Nesta área, a nanotecnologia tem vindo a comprovar-se promissora, inúmeros estudos efetuados ao longo dos últimos anos reportam a sua segurança e baixa toxicidade na aplicação a sistemas de libertação controlada de fármacos, proteínas, péptidos ou ácidos nucleicos, visando uma maior efetividade dos mesmos e redução dos seus efeitos adversos.^{7 8 9}

É neste âmbito que surge a monografia em questão, que pretende efetuar uma revisão teórica acerca de estudos recentes na área da nanotecnologia aplicada ao tratamento e profilaxia da infeção pelo vírus do VIH.

3 Imunidade

A imunidade é a capacidade de resistir às agressões de substâncias exógenas, como microrganismos e substâncias químicas nocivas, dividindo-se em imunidade inata e imunidade adaptativa.

A imunidade inata não compreende mecanismos de memória, pelo que o organismo reconhece e destrói algumas substâncias estranhas, mas a resposta é sempre a mesma em cada exposição.

Por sua vez, a imunidade adaptativa é mais específica, o organismo reconhece e destrói as substâncias estranhas mas a resposta aumenta cada vez que se dá uma exposição ao agente agressor, devido à sua capacidade de memorizar as características de cada agente.¹

3.1 Imunidade Inata

A imunidade inata é constituída pelos seguintes componentes:

- ❖ Fatores mecânicos, os quais evitam a entrada de microrganismos no organismo ou fazem a sua remoção da superfície corporal;
- ❖ Mediadores químicos, cuja ação poderá ser diretamente contra os microrganismos ou através da ativação de mecanismos que levam à destruição dos mesmos;

- ❖ Células respeitantes à fagocitose e produção de substâncias químicas que participam na resposta imunitária.¹

3.1.1 Fatores Mecânicos

Os fatores mecânicos são a primeira forma de proteção do organismo, pois ao evitarem a penetração dos microrganismos evitam que estes sejam agentes causadores de doença.

São exemplos a barreira formada pela pele e mucosas, as lágrimas, saliva e urina que contribuem para a expulsão de substâncias presentes nos olhos, boca e vias urinárias, respetivamente. Quanto às vias aéreas, os principais fatores mecânicos são a tosse, o espirro e as mucosas ciliadas, que transportam os microrganismos captados pelo muco para a faringe, para serem deglutidos.¹

3.1.2 Mediadores Químicos

Existem mediadores químicos que se encontram na superfície das células cuja função é eliminar ou evitar a entrada de organismos nas células, como é o caso da lizosima, o sebo e o muco.

Outros mediadores químicos, por sua vez, favorecem o estabelecimento da inflamação através da indução da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, captação de leucócitos e estimulação da fagocitose, como é o caso da histamina, sistema complemento, prostaglandinas e leucotrienos.

Além destes, o interferão protege as células contra as infeções virais.¹

3.1.3 Células

O componente celular mais importante do sistema imunitário são os leucócitos e as células que deles derivam.

Os leucócitos são produzidos na medula óssea vermelha e no tecido linfático e, posteriormente, são libertados no sangue e transportados a todo o organismo, sendo atraídos até aos tecidos onde são necessários pelos fatores quimiotáticos. Estes fatores são componentes de microrganismos ou produtos químicos, libertados pelas células nos tecidos, sendo os mais importantes o complemento, leucotrienos, cininas e histamina. Os leucócitos são capazes de detetar pequenas diferenças de concentração dos fatores quimiotáticos, pelo que se deslocam dos locais onde estão em menor concentração para aqueles em que há maior concentração. Desta forma, os leucócitos deslocam-se para a fonte dos mediadores, por movimento amebóide, pela superfície das células, entre as células ou diretamente através de outras células. Esta capacidade de deslocação dos leucócitos é designada por quimiotaxia.

Ao fenómeno de endocitose e destruição de partículas por parte dos fagócitos dá-se o nome de fagocitose. As partículas em questão podem ser microrganismos ou parte destes, substâncias estranhas ou células mortas do organismo. As células fagocitárias mais importantes são os neutrófilos e os macrófagos.¹

3.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa está relacionada com a capacidade de reconhecer, responder e memorizar uma determinada substância, que pode ser um antigénio ou um hapteno. O antigénio é uma substância de grande peso molecular, enquanto que o hapteno tem baixo peso molecular e tem a capacidade de se combinar com moléculas maiores, como proteínas sanguíneas, para estimular a resposta imunitária adaptativa.

Os antígenos podem ser antígenos estranhos e auto antígenos, sendo os primeiros aqueles que não são produzidos pelo organismo, mas são nele introduzidos (componentes de bactérias, vírus, pólen, medicamentos, etc...) e, por sua vez, os auto antígenos são moléculas produzidas pelo organismo que estimulam a resposta imunitária adaptativa. A resposta a auto antígenos pode ser benéfica, por exemplo no reconhecimento de antígenos tumorais que conduz à destruição do tumor, ou então prejudicial, em casos de doenças autoimunes em que os auto antígenos estimulam a destruição de tecidos saudáveis.

A imunidade adaptativa resulta da atividade de dois tipos de linfócitos, as células B e T. As células B estimulam a produção de anticorpos, já as células T são responsáveis pela imunidade mediada por células. Existem várias subpopulações de células T, como as células T efectoras, células T citotóxicas e células T de hipersensibilidade retardada, responsáveis pelos efeitos da imunidade mediada por células, enquanto que as células T reguladoras, células *Helper* e as células T supressoras têm a capacidade de regular a imunidade mediada por células e por anticorpos.¹

3.2.1 Origem e maturação dos Linfócitos

Os linfócitos, assim como todas as células sanguíneas, derivam das células estaminais da medula óssea vermelha. Este é um processo que se inicia durante o desenvolvimento embrionário e continua ao longo da vida. Assim, algumas células estaminais dão origem às células pré T, as quais migram pelo sangue até ao timo, onde se dividem e maturam, originando as células T. Por sua vez, outras células estaminais originam células pré B, que maturam na medula óssea vermelha em células B.

As células B são então libertadas a partir da medula óssea vermelha, assim como as células T são libertadas a partir do timo, sendo ambas transportadas no sangue até ao sistema linfático. Geralmente, existem cerca de cinco células T por cada célula B, e estes linfócitos têm um período de vida que poderá variar desde poucos meses até vários anos, circulando continuamente entre o sangue e os tecidos linfáticos. Os antígenos

podem entrar em contato com os linfócitos e ativá-los, originando divisão celular e aumentando o número de linfócitos, assim como estes linfócitos poderão circular no sangue e linfa e ir ao encontro dos antígenos que se encontrem em qualquer tecido do organismo.¹

3.2.2 Ativação dos Linfócitos

Os linfócitos podem ser ativados pelos antígenos de várias formas, dependendo do tipo de linfócito e antígeno envolvidos. No entanto, existem dois princípios gerais da ativação linfocitária:

1. Os linfócitos têm de ser capazes de reconhecer o antígeno;
2. Após o reconhecimento, o número de linfócitos tem de aumentar para que haja uma destruição eficaz do antígeno.

Alguns antígenos fazem a ligação aos seus recetores e ativam diretamente as células B e algumas das células T. Contudo, a grande parte da ativação dos linfócitos tem a intervenção de glicoproteínas da superfície das células, os antígenos do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC). Estes antígenos fixam-se na membrana celular e têm uma região variável, que se pode ligar a auto antígenos e a antígenos estranhos.

Os antígenos do complexo *major* de histocompatibilidade de classe I (MHC I) (Figura 2.1a) encontram-se nas células nucleadas e têm como função expressar os antígenos produzidos dentro da célula, na superfície celular. Esta etapa é muito importante, pois o sistema imunitário não pode responder diretamente a um antígeno dentro de uma célula.

A título de exemplo, os vírus replicam-se dentro das células, dando origem a proteínas virais que são antígenos estranhos e algumas destas proteínas desdobram-se no citoplasma. Os fragmentos proteicos, ao entrar no retículo endoplasmático rugoso, combinam-se com antígenos do MHC I e formam complexos que vão para o aparelho de Golgi e posteriormente são distribuídos na superfície da célula.

Na superfície da célula, o complexo antígeno-antígeno do MHC I pode ligar-se a um recetor da célula T, ativando a célula T. Esta ativação pode conduzir à destruição da célula, determinando o fim da replicação viral, uma vez que o complexo antígeno-MHC induz o sistema imunitário à destruição da célula em causa. Este é portanto um processo MHC limitado, dado que é necessária a intervenção de um antígeno e do antígeno do MHC do próprio organismo.

Os antígenos MHC de classe II (MHC II) (Figura 2.1b) encontram-se nas células apresentadoras de antígenos, onde se incluem as células B, macrófagos, monócitos e células dendríticas.

As células apresentadoras de antígenos estão especializadas em captar antígenos estranhos, processá-los e levar os antígenos MHC II a apresentar os antígenos estranhos a outras células do sistema imunitário. Por exemplo, o complexo antígeno-MHC II pode ligar-se ao

recetor das células T e, contrariamente ao que sucede com os antígenos MHC I, este tipo de expressão não leva à destruição da célula apresentadora do antígeno. Em vez disso, o complexo antígeno-MHC II vai estimular outras células do sistema imunitário a reagir contra o antígeno.

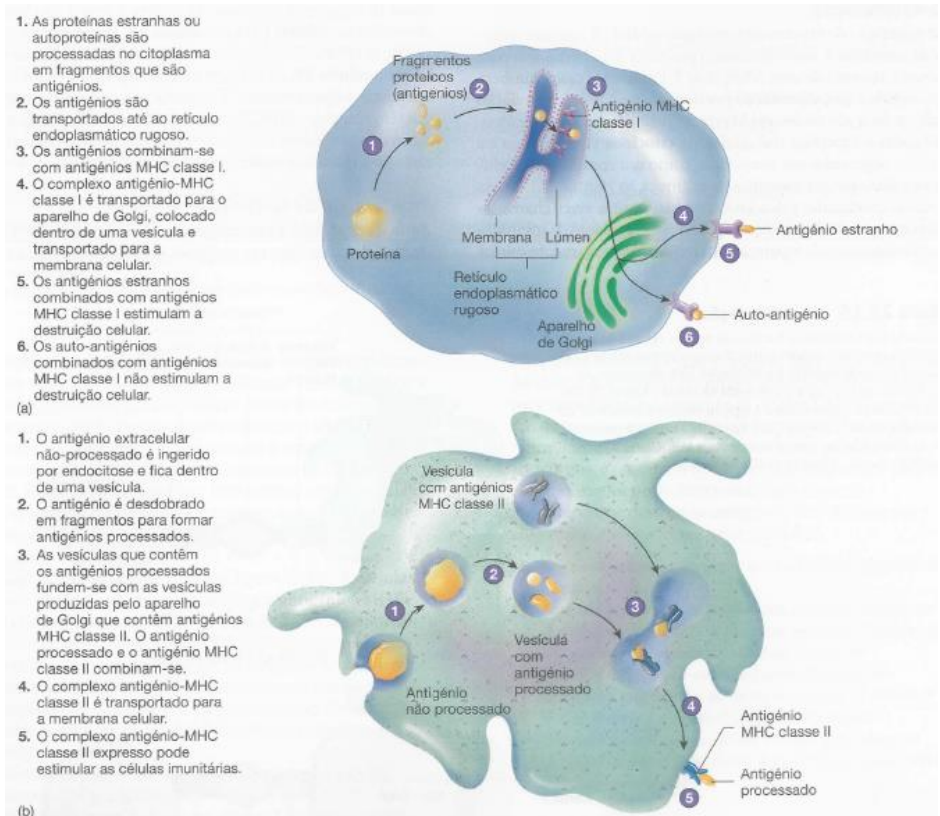


Figura 3.1: Processamento de antígenos.¹

3.2.3 Co Estimulação

A combinação de um complexo antígeno-MHC II com um recetor de antígeno é geralmente o primeiro sinal necessário a induzir a resposta de uma célula B ou T. Contudo, em muitos casos é também necessário que haja uma co estimulação por outros sinais, como moléculas libertadas pelas células ou que estejam ligadas à superfície das mesmas (Figura 2.2a). Por

exemplo, as citocinas são proteínas ou péptidos segregadas por uma célula que promovem a co estimulação. Estas substâncias estão implicadas na regulação da imunidade, inflamação, reparação dos tecidos, crescimento celular, entre outros.

Existem também determinados pares de moléculas de superfície que podem estar implicados na co estimulação, normalmente são necessários vários tipos diferentes de moléculas de superfície para induzir reação (Figura 2.2b).

Exemplificando, uma molécula B7 nos macrófagos tem de se ligar à CD28 das células *Thelper*, antes que estas possam reagir com o antígeno levado pelo macrófago. Além disso, as *Thelper* têm uma glicoproteína, a CD4, que as ajuda a ligarem-se ao macrófago, através da ligação aos antígenos MHC II, pelo que as *Thelper* são por vezes denominadas de células CD4 ou T4. O mesmo acontece relativamente às células T citotóxicas que, tendo uma glicoproteína CD8 que promove a ligação daquelas às células do organismo que têm antígenos MHC I, também são designadas por células CD8 ou células T8.

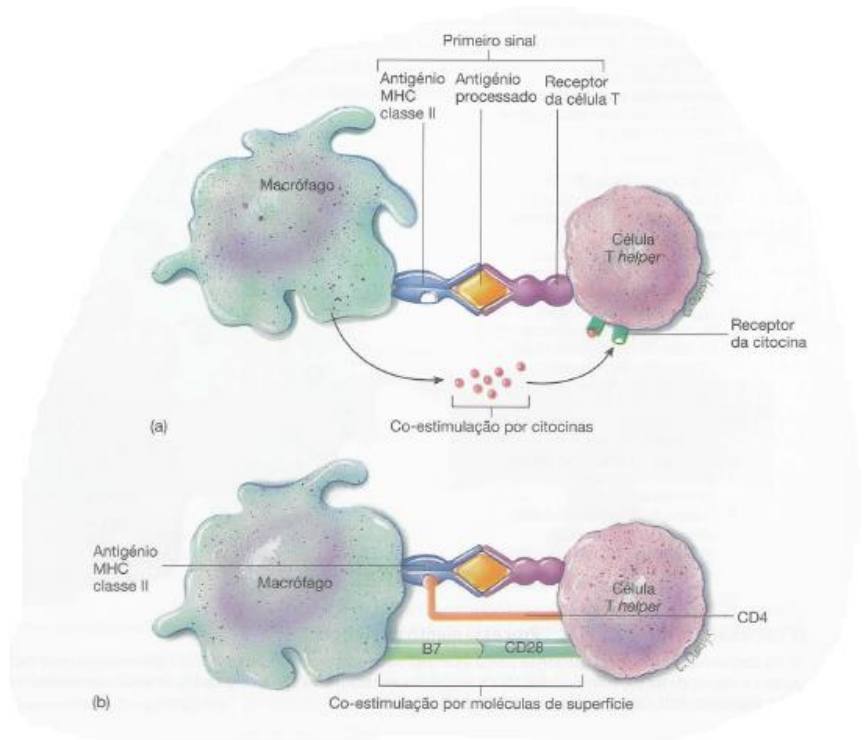


Figura 3.2: Processo de Co Estimulação. ¹

3.2.4 Proliferação de Linfócitos

Antes da exposição a um dado antigénio, o número de linfócitos num clone é demasiado pequeno para produzir uma reação eficaz contra o antigénio, pelo que é a exposição que vai determinar o aumento do número de linfócitos. Deste processo fazem parte dois momentos chave:

1. Proliferação das células *Thelper*. As células apresentadoras de antigénios utilizam antigénios MHC II para apresentar os antigénios processados às *Thelper*. Apenas as *Thelper* com capacidade de ligação ao antigénio é que respondem, resultando na sua divisão. Desta forma o número de células *Thelper* de reconhecimento do antigénio aumenta;
2. Proliferação e ativação das células B ou das T. Este processo envolve normalmente as células *Thelper*. O processo é semelhante para ambos os tipos de células, contudo, tomemos a título de exemplo as células B.

Antes de uma célula B poder ser ativada uma célula *Thelper*, a primeira tem de processar o mesmo antigénio que ativou a célula *Thelper*. O antigénio liga-se ao recetor da célula B e ambos são introduzidos na célula por endocitose. Seguidamente, a célula B utiliza um antigénio MHC II para apresentar o antigénio processado à célula *Thelper*, a qual liberta várias interleucinas que ativam a célula B a dividir-se. Por fim, as células B ativadas e as suas descendentes dividem-se sucessivamente, produzindo um número elevado de células B e, conseqüentemente, um elevado número de anticorpos é produzido. Assim, é determinada uma resposta imunitária capaz de destruir os antigénios.

3.2.5 Inibição de Linfócitos

O conceito de tolerância designa o estado no qual os linfócitos não respondem a um antigénio específico. Ainda que os antigénios estranhos possam induzir tolerância, a função mais importante da tolerância é evitar que o sistema imunitário reaja contra os auto antigénios. A tolerância pode ser induzida através os seguintes processos:

1. Eliminação dos linfócitos auto reativos. Se um linfócito imaturo for exposto aos antigénios, o primeiro morre, em vez de responder de uma forma que conduza à destruição do antigénio. Esta é uma forma de eliminar os linfócitos, já que no estado imaturo os linfócitos apenas contactam com auto antigénios. Cumulativamente, os linfócitos imaturos que não são eliminados durante o processo de maturação e que, já num estágio maduro, apresentam atividade contra os auto antigénios também podem ser eliminados;
2. Prevenção da ativação dos linfócitos. Para que um linfócito seja ativado tem de ocorrer ligação do complexo antigénio-MHC com um recetor de antigénio e co estimulação. Se um destes estímulos não ocorrer, a ativação dos linfócitos é cancelada. Se o recetor do antigénio for bloqueado, modificado ou eliminado, também não se dá a ativação;
3. Ativação das células T supressoras. As células T supressoras têm a capacidade de suprimir a resposta imunitária. Pensa-se que estas células T sejam subpopulações das células *Thelper* e das células T citotóxicas.

3.2.6 Imunidade Mediada por Células

A imunidade mediada por células é uma das funções das células T e é a mais eficaz contra os microrganismos intracelulares, tais como vírus, fungos, bactérias intracelulares e parasitas. Trata-se também do tipo de imunidade implicado nas reações de hipersensibilidade e no controlo de tumores.

As células T são ativadas contra os antigénios, sob a regulação das células apresentadoras de antigénios e das *Thelper*. Quando ativadas, as células T dividem-se diversas vezes, dando origem a células T efetoras e células T de memória. As células T efetoras e as células T citotóxicas são responsáveis pelas reações imunitárias mediadas por células. Posteriormente, as células T de memória podem fornecer uma resposta secundária e imunidade de longa duração, de forma semelhante ao que ocorre com as

células B de memória (Figura 2.3).secundária e imunidade de longa duração, de forma semelhante ao que ocorre com as células B de memória (Figura 2.3).

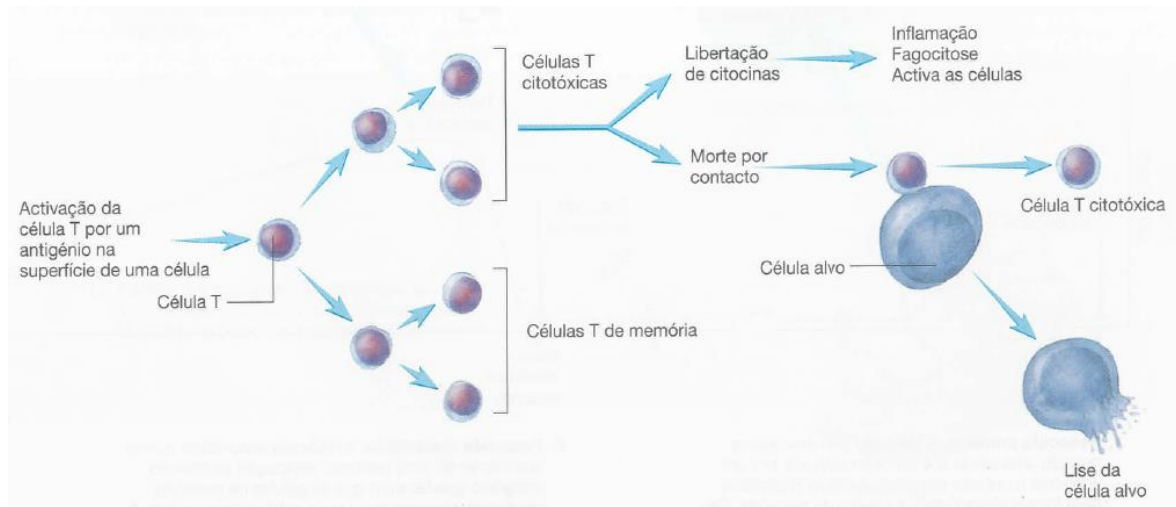


Figura 3.3: Estimulação e ações das células T. ¹

As células T citotóxicas têm como funções principais a lise de células e a produção de citocinas, podendo entrar em contacto com outras células e determinar a sua destruição. As células infetadas por vírus têm antígenos virais, as células tumorais têm antígenos tumorais e os tecidos transplantados têm, à superfície, antígenos estranhos que podem estimular a atividade das células T citotóxicas.

A célula T citotóxica liga-se á célula alvo e liberta mediadores químicos que induzem a destruição da mesma. O principal mecanismo de lise envolve uma proteína, a perforina, que origina um orifício na célula alvo e, posteriormente a célula T citotóxica liberta-se da célula alvo e liga-se a outras para induzir o mesmo processo. A libertação de citocinas vai ativar outros componentes do sistema imunitário, como é o caso dos macrófagos, que após recrutados pelas citocinas, ficam responsáveis pela fagocitose e inflamação.

As células T de hipersensibilidade retardada reagem aos antígenos através da libertação de citocinas. Desta forma favorecem a fagocitose, inflamação, especialmente no caso das reações alérgicas, podendo causar reações inflamatórias intensas.

4 A Infecção por VIH

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um lentivírus, uma família de retrovírus mamíferos que estabelecem uma infecção crónica e persistente, cujos sintomas clínicos surgem gradualmente. A sua replicação é constante, seguida de infecção e, apesar de algumas células infetadas poderem conter o vírus sem que este se replique durante anos, não existe um verdadeiro período de latência neste tipo de infecção. Os únicos hospedeiros do VIH conhecidos são os humanos e os chimpanzés.¹⁰

Existem duas estirpes de VIH, o VIH-1 que é responsável pela maioria dos casos de infecção a nível mundial e o VIH-2, cuja distribuição se restringe ao oriente africano.¹⁰

4.1 Estrutura do vírus

O VIH é um retrovírus cujo genoma está contido em duas cadeias de ARN, que estão encerradas numa nucleocápside cónica, envolta por uma bicamada lipídica, o envelope, o qual é adquirido da membrana celular do hospedeiro (Figura 3.1).¹¹

O genoma viral contém três genes cruciais para o processo infeccioso. O gene *gag* codifica uma poliproteína precursora

cujas funções são libertar as proteínas estruturais dos vírus; o gene *pol* localizado imediatamente a seguir a *gag*, codifica uma poliproteína precursora que ao ser clivada dá origem às enzimas transcriptase reversa, integrase e protease; por fim, o gene *env* codifica a proteína precursora gp160 altamente glicosilada, que é clivada por ação da

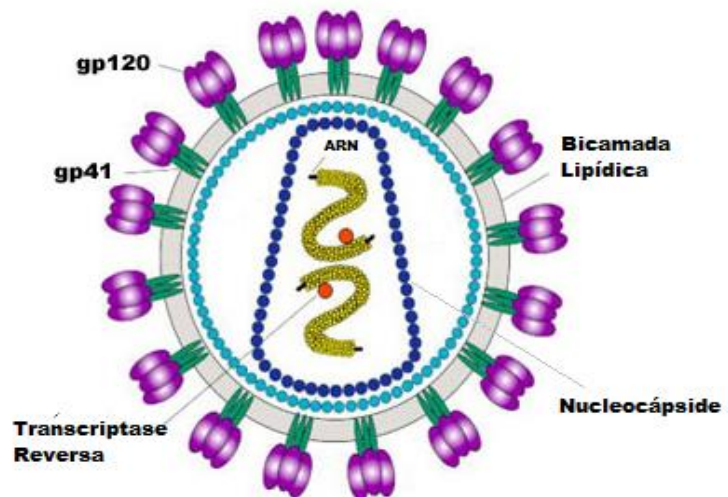


Figura 4.1: Estrutura do VIH.⁸⁵

protease celular, dando origem à glicoproteína de superfície gp120 e à glicoproteína transmembranar gp41. ¹¹

Existem também pequenos genes que codificam proteínas reguladoras que aumentam a produção viral ou combatem as defesas do hospedeiro, como é o caso de *tat*, *rev*, *nef*, and *vpr*. ^{10,11}

4.2 Mecanismo de Infecção

A infecção viral tem início quando a glicoproteína gp120 se liga ao recetor celular CD4, o qual existe principalmente nas células *Thelper* e as impossibilita de aderir a outros linfócitos, por exemplo durante o processo de apresentação dos antígenos. Seguidamente, dá-se a ligação entre gp120 e o recetor das quimiocinas (CXCR4 ou CCR5), resultando em alterações conformacionais que vão expor a gp41, conduzindo à fusão entre a célula alvo e o vírus e, por fim, à internalização da nucleocápside viral (Figura 3.2). ^{11,12}

Após a fusão, o ARN viral entra no citoplasma e inicia a replicação, originando um complexo ARN-ADN transitório. O ARN viral é degradado, dando lugar à produção de ADN com a informação viral, o qual é transportado para o núcleo, onde é integrado num cromossoma do hospedeiro pela integrase viral, numa posição aleatória. Posteriormente à integração, o vírus pode permanecer num estado quiescente, sem produção de ARN ou proteínas, mas em constante replicação a cada vez que a célula se divide. Quando uma célula que contém o vírus é ativada, o ARN e proteínas virais são produzidos, pelo que as proteínas estruturais ficam dispostas à volta do ARN para formar uma nucleocápside, que emerge até a superfície celular. É então criado um novo envelope contendo ARN viral, onde a transcriptase reversa é incorporada para que a replicação possa começar assim que o vírus entre numa nova célula (Figura 3.1). ^{1,10-12}

As primeiras células alvo do vírus são as células T, no entanto existem outras células que podem também interagir com o vírus, ficar infetadas e transmiti-lo a outras células, como é o caso dos macrófagos e células dendríticas. ¹¹

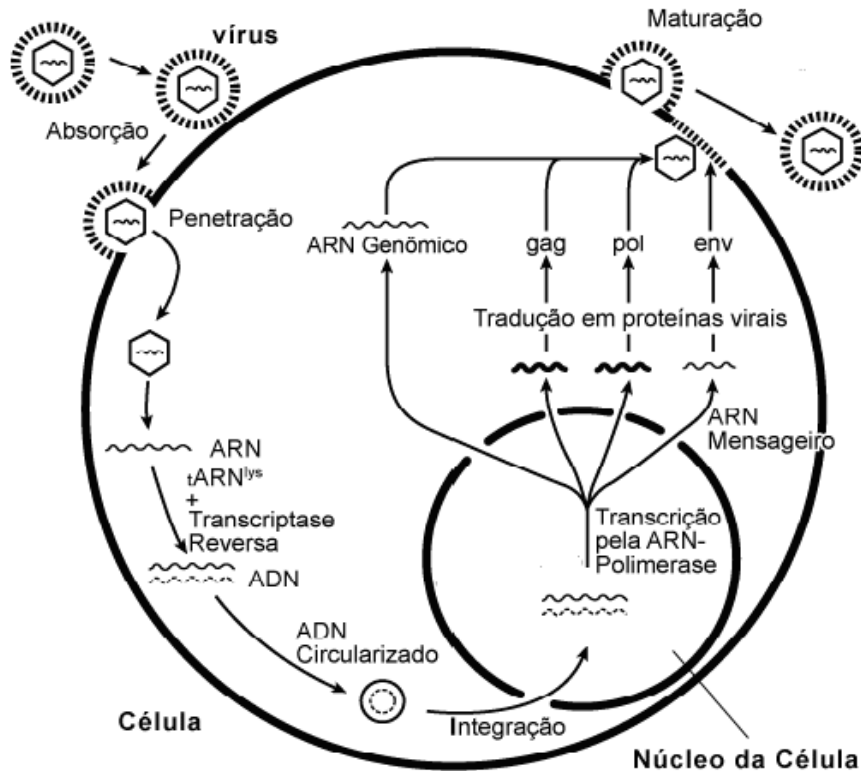


Figura 4.2: Replicação do VIH-1. ¹³

4.3 Da Infecção por VIH à SIDA

O VIH é transmitido de um indivíduo infetado a um indivíduo não infetado através do contato com líquidos orgânicos como o sangue, esperma ou secreções vaginais. As principais vias de transmissão são os contatos sexuais não protegidos, agulhas contaminadas usadas por toxicodependentes, produtos derivados do sangue e da mulher grávida infetada para o feto. As crianças podem ser infetadas antes do nascimento, durante o parto ou durante o aleitamento materno.¹

Após a infecção, ocorrem múltiplas replicações, atingindo o seu pico entre duas a quatro semanas, com cerca de 10^9 células infetadas. Os doentes que se encontram nesta fase desenvolvem, num período que varia entre três semanas a três meses, um síndrome agudo e súbito semelhante à mononucleose, cujos sintomas são febre, sudorese, fadiga,

dores musculares e articulares, cefaleias, dores de garganta, diarreia, eritema e adenopatias.¹

Em resposta, o sistema imunitário desencadeia a imunidade adaptativa, aumentando o número de células *Thelper*, o que resulta na ativação das células T citotóxicas, as quais vão eliminar as células infetadas pelo VIH. Desta forma, os sintomas acima descritos são debelados.¹⁰

O sistema imunitário não consegue eliminar o VIH, no entanto, em cerca de seis meses, o número de partículas de vírus (também designado por carga viral) vai-se replicando a uma velocidade menor e estabiliza. Este é um estágio crónico da infeção, no qual o indivíduo infetado pode permanecer em média oito a dez anos sentindo-se bem, com pouco ou até nenhum sintoma da doença.^{1,11}

Apesar das células *Thelper* serem infetadas e destruídas pelo sistema imunitário, no período de cronicidade, o organismo responde aumentando a sua produção. Contudo, ao longo dos anos a carga viral vai aumentando gradualmente, enquanto que o número de células *Thelper* vai diminuindo.¹¹

Normalmente, existem cerca de 1200 células *Thelper*/mm³ de sangue, no entanto, considera-se que uma pessoa infetada com o VIH tem SIDA quando um ou mais dos seguintes fatores está presente: o número de células *Thelper* é inferior a 200/ mm³, eclode uma infeção oportunista ou desenvolve-se um sarcoma de Kaposi.¹⁴

Uma infeção oportunista é originada por organismos que normalmente não produzem doença, mas são capazes de o fazer quando existe imunodepressão. Quando não existem células *Thelper*, a ativação das células T citotóxicas e das células B está comprometida, pelo que a imunidade adaptativa é suprimida. Eis alguns exemplos de infeções oportunistas: pneumonia (*Pneumocystis carinii*), a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), a sífilis (*Treponema pallidum*), a candidíase (*Candida albicans*) e também alguns protozoários que determinam o aparecimento de diarreias persistentes.^{1,14}

O sarcoma de Kaposi é uma neoplasia que produz lesões na pele, gânglios linfáticos e vísceras. Também estão associados à SIDA sintomas resultantes do efeito do vírus no

sistema nervoso, como é o caso de alterações ao nível motor e comportamental, demência progressiva e, possivelmente psicoses.¹

5 Soluções Terapêuticas

Atualmente, não existem fármacos com capacidade para erradicar a infeção por VIH. Os doentes poderão ser submetidos a uma terapêutica que implique dois objetivos: 1) redução da replicação viral e 2) tratamento das infeções oportunistas ou neoplasias associadas à SIDA.¹⁵

Dado o ciclo da replicação viral anteriormente descrito, e apesar de haver vários passos do ciclo viral com potencial para uma futura intervenção antiviral, os fármacos atualmente existentes na terapêutica antirretroviral atuam em três momentos da replicação: fusão do vírus à célula hospedeira; transcrição reversa, que promove a produção de ADN viral a partir de ARN viral, e processo proteolítico, que permite a quebra de grandes cadeias virais em cadeias de menor dimensão capazes de integrar novas unidades de VIH.¹⁰ Desta feita, os fármacos anti retrovirais existentes em Portugal dividem-se em três categorias: inibidores da fusão, inibidores da transcriptase reversa (os quais podem ser análogos nucleósidos ou não nucleósidos) e inibidores da protease (Figura 4.1).¹⁶

Os análogos dos nucleosídeos necessitam de ser fosforilados a nível intracelular para exercerem a sua ação antivírica, em contraste com os não nucleosídeos cuja atividade não depende da metabolização, o que os torna eficazes contra o VIH em estado latente.

A enfurvitida inibe a reconfiguração estrutural da gp41 do VIH, inibindo a fusão do vírus aos linfócitos.

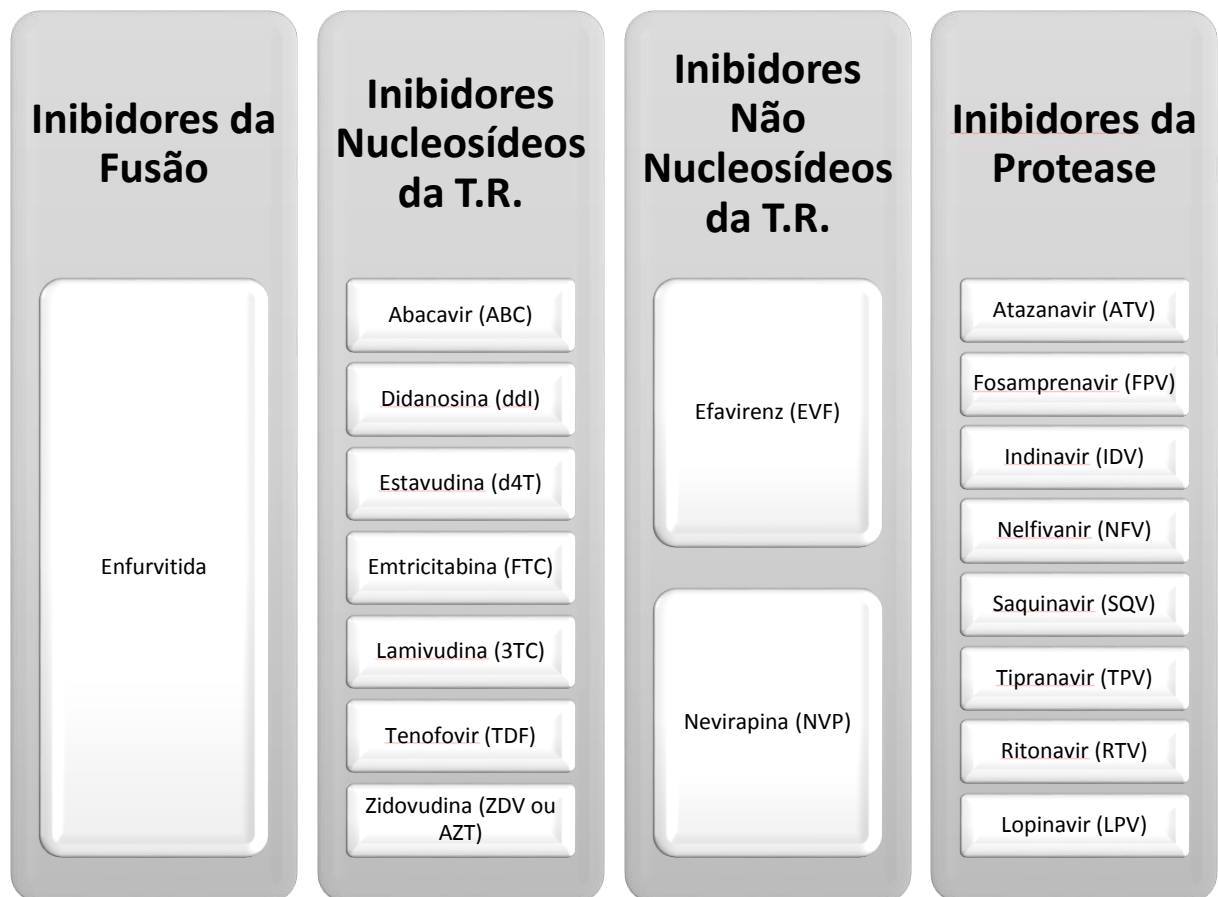


Figura 5.1: Fármacos anti retrovirais existentes em Portugal. ¹⁶

Os fármacos com ação contra o VIH têm um perfil farmacológico complexo, sendo todos suscetíveis de causar reações adversas graves, assim como apresentam interações medicamentosas clinicamente significativas. Por exemplo, o ritonavir é um inibidor potente do CYP3A4 e indutor de algumas isoenzimas, como é o caso do CYP1A4, pelo que é muito provavelmente o fármaco que apresenta o maior número de interações medicamentosas. Algumas das referidas interações podem até mostrar-se favoráveis, pois permitem a utilização de doses menores ou de intervalos de administração mais prolongados e, conseqüentemente, reduzem os custos da terapêutica.^{10,16}

O tratamento da infeção por VIH assume que todos os aspetos da doença têm origem no efeito tóxico que o VIH causa nas células hospedeiras, principalmente nos linfócitos T CD4, já que os estádios mais avançados, e que acabam por ser mortais, implicam uma elevada carga viral em contraste com uma contagem de células CD4 baixa.

As soluções terapêuticas atualmente existentes pretendem apenas suprimir a replicação viral ao máximo, durante o maior tempo possível, por forma a possibilitar da forma mais duradoura a qualidade de vida do paciente. Contudo, devido à complexidade da terapêutica e respetivas reações adversas, ao delinear a estratégia terapêutica para tratar determinado paciente infetado com VIH existem várias questões que se colocam à partida:

- ❖ Quando iniciar o tratamento antirretroviral?
- ❖ Qual o esquema a utilizar?
- ❖ Como avaliar a eficácia?
- ❖ Quando modificar o esquema?

O início da terapêutica num indivíduo assintomático com infeção por VIH permite um maior controlo da replicação viral, prevenção e diminuição do compromisso imunológico, diminui o risco de resistência se a supressão viral for completa, assim como diminui o risco de transmissão do VIH. No entanto, os riscos que esta opção acarreta podem tornar-se devastadores, já que a qualidade de vida do paciente poderá ficar comprometida devido ao efeito cumulativo das reações adversas dos fármacos anti retrovirais, poderá verificar-se o desenvolvimento mais precoce de resistência caso a supressão viral não seja completa e ainda existe o risco de transmissão de vírus resistentes aos anti retrovirais (em caso de supressão viral incompleta), o que limita futuras opções terapêuticas.

Desta forma, o início da terapêutica tardio, apenas quando o paciente evidencia valores mais elevados de carga viral e/ou contagem de CD4 mais baixa, evita os efeitos adversos da terapêutica e, conseqüentemente, permite melhorar as condições de vida, permite adiar o desenvolvimento de resistências, preservando-se assim futuras opções terapêuticas. Os principais riscos desta opção prendem-se com o possível compromisso irreversível do sistema imunológico, maior dificuldade em suprimir a replicação viral, assim como maior do risco de transmissão do VIH. ¹⁷

Existem também opções no que diz respeito às medicinas complementares, como é o caso da utilização de suplementos. No tratamento da SIDA, os médicos naturopatas

costumam recomendar a administração de betacarotenos, vitamina C e E, óleo de fígado de bacalhau, multivitaminas e coenzima Q10.

Um estudo efetuado acerca dum tratamento fitoterapêutico chinês baseado em 31 plantas demonstrou reduzir os sintomas da doença e das infeções oportunistas associadas em comparação com o grupo placebo. De entre estas plantas encontram-se extratos de cogumelo maitake, alcaçuz, concentrado de alho, óleo da árvore do chá, entre outros. Neste âmbito existe ainda a homeopatia, acupunctura, assim como a psicoterapia e redução do stress, os quais pretendem melhorar o estado mental e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida. São exemplos a massagem terapêutica, humoterapia, exercício aeróbio e terapia cognitiva.¹⁸

6 Soluções Profiláticas

No que diz respeito à profilaxia do VIH, esta divide-se em profilaxia pré exposição e profilaxia pós exposição. Tal como as designações indicam, a primeira refere-se às ações tomadas, no sentido de evitar a transmissão do VIH, antes de qualquer contato com o vírus; enquanto que a segunda se refere às ações tomadas no sentido de evitar a progressão da infeção pelo vírus, após uma exposição ao mesmo. ¹⁴

A profilaxia pré exposição engloba todas as ações que informam acerca deste tema, procurando sensibilizar e educar quanto aos comportamentos de risco que originam a transmissão do vírus, programas de troca de seringas e distribuição de preservativos femininos e masculinos, assim como a utilização de metadona ou buprenorfina no tratamento da dependência de opióides por forma a evitar o uso de injetáveis na administração. Nesta categoria ainda se insere a terapêutica antirretroviral (TAR), a qual é recomendada em casais serodiscordantes, por forma a reduzir a transmissão do VIH para os parceiros saudáveis. ¹⁴

Em Portugal, são inúmeras as entidades que realizam ações no sentido de fazer uma profilaxia pré exposição. É exemplo Administração Regional de Saúde, do Ministério de

Saúde, que criou os Centros de Aconselhamento e Detecção Precoce da Infecção por VIH/SIDA (CAD), existentes em vários pontos de Portugal. No CAD são feitos os testes rápidos do VIH, distribuídos preservativos, assim como é dado o aconselhamento e a informação que o utente necessitar, mantendo a confidencialidade do mesmo. Todos os serviços e produtos distribuídos no CAD são gratuitos.¹⁹

A Associação Nacional das Farmácias (ANF), em parceria com a Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA (CNSIDA) iniciou o Programa de Troca de Seringas em 1993, com o objetivo de prevenir a transmissão do VIH entre os utilizadores de drogas injectáveis (UDI), através da distribuição do material esterilizado e da recolha e destruição do material utilizado pelos UDIs ao nível das farmácias, postos móveis e organizações parceiras.²⁰ Este Programa contribuiu para uma grande diminuição do número de infeções por VIH em Portugal, sendo que nos primeiros 8 anos foram evitadas mais de 7.000 infeções por VIH/Sida por cada 10.000 utilizadores de drogas injetáveis.²⁰

De acordo com o Relatório Mundial da Droga de 2010 da ONU, Portugal é um dos países com mais sucesso na troca de seringas por UDIs. Segundo este Relatório, apenas 11 países em todo o mundo ultrapassam as 150 seringas anuais por utilizador, sendo Portugal um desses países. Segundo o Observatório Europeu da Droga e da Toxicoddependência, a seguir à França, o nosso país apresenta a maior proporção de envolvimento das farmácias na troca de seringas, em toda a Europa.²⁰

A profilaxia pós exposição baseia-se na administração da TAR durante 28 dias após a exposição ao VIH, sendo que a primeira dose deverá ser administrada até 72 horas após a exposição. Segundo a OMS, esta medida de profilaxia deverá ser aplicada em casos de abuso sexual.²¹

7 A nanotecnologia no tratamento e profilaxia do VIH-1

A nanotecnologia engloba a síntese e manipulação de materiais com dimensão à escala nanométrica, isto é, à escala de 10^{-9} metros.²²⁻²⁵ As partículas a esta escala têm propriedades físico-químicas únicas, que as distinguem das partículas à escala macroscópica, microscópica e até da escala atómica.^{23,24,26}

As nanopartículas têm uma dimensão semelhante aos anticorpos, recetores de membrana, ácidos nucleicos e proteínas, entre outras biomoléculas, o que facilita os mecanismos de passagem por barreiras biológicas, os quais têm por base o tamanho das partículas. Cumulativamente, apresentam uma elevada razão superfície/volume, fator que contribui para uma maior solubilidade deste tipo de partículas.^{24,27,28} Estes factos, entre outros, vieram comprovar potencialidades da aplicação da nanotecnologia à medicina, no sentido de encontrar novos sistemas para diagnosticar, tratar e prevenir doenças humanas.²⁹

Desta forma, a inclusão de fármacos em sistemas à escala nanométrica tem sido objeto de estudo no tratamento e profilaxia de várias doenças, incluindo a infeção por VIH, área onde poderá trazer imensos benefícios (Tabela 6.1), pois as soluções terapêuticas existentes apresentam várias limitações e não conseguem erradicar efetivamente a patologia.³⁰

Apesar destes sistemas aplicados à terapêutica do VIH-1 apresentarem potencial para solucionar algumas limitações da terapêutica convencional, como a passagem pelas barreiras celulares e anatómicas, elevada toxicidade, baixa adesão à terapêutica e baixas concentrações nos sítios alvo, existem ainda obstáculos como a segurança, eficácia, toxicidade a longo prazo, resposta imunitária inesperada e custos da produção à larga escala.³¹⁻³⁸

Tabela 7.1: Potenciais benefícios da aplicação na nanotecnologia à terapêutica da infeção por VIH (adaptado).⁶

Propriedade Física	Implicações Biológicas	Potenciais Benefícios na Terapêutica do VIH
Tamanho da partícula	Afeta a biodisponibilidade e o tempo de circulação. Tamanhos <5-10 nm são removidos pela clearance renal; ≈ 70nm penetram nos capilares; 35-120nm localizam-se nos nódulos linfáticos.	Nanopartículas contendo indinavir foram injetadas via subcutânea em macacos e o seu tamanho permitiu a sua localização no sistema linfático. Aí permaneceram, sem entrar na corrente sanguínea, evitando os picos indesejáveis de concentração plasmática.
	Consoante o tamanho as partículas podem ser opsonizadas pelas proteínas plasmáticas, fagocitadas pelos macrófagos ou removidas pelo retículo endoplasmático.	Lipossomas contendo zidovudina didanosina foram fagocitados pelos macrófagos e direcionados até ao retículo endoplasmático do rato.
Razão superfície/volume	As nanopartículas apresentam maior solubilidade relativamente às de maior dimensão.	É possível incorporar fármacos com baixa solubilidade em nanopartículas, por forma a aumentar a biodisponibilidade dos mesmos, como por exemplo a rilpivirina.
Carga superficial	A membrana celular é carregada negativamente e repele moléculas com a mesma carga. As nanopartículas com carga positiva poderão incorporar as referidas moléculas, permitindo a sua entrada na célula.	É possível administrar fármacos anti retrovirais carregados negativamente, como ácidos nucleicos e análogos nucleósidos fosforilados.
Formação de estruturas estáveis capazes de encapsular fármacos	A encapsulação aumenta a solubilidade e protege os fármacos da degradação, por exemplo gastrointestinal.	Micelas poliméricas encapsularam o efavirenz e aumentaram a sua solubilidade. Em estudos in vitro, uma nanocápsula polimérica contendo zidovudina na sua forma trifosforilada, direcionou o fármaco até ao citoplasma.
Biofuncionalização das nanopartículas	A conjugação com polietilenoglicol (PEG) aumenta a solubilidade e reduz a interação com proteínas, que poderão opsonizar as partículas, permitindo modular a biodisponibilidade.	Nanopartículas e lipossomas contendo zidovudina e didanosina, respetivamente, foram estabilizados com PEG. Como resultado verificou-se um aumento do tempo de meia vida dos fármacos.
Multifuncionalidade	Os antiretrovirais atualmente disponíveis não são ativos contra o vírus em estado latente. Os nanofármacos podem, em simultâneo, estimular a replicação viral e levar fármacos à célula ativada.	Nanopartículas lipídicas contendo briostatina-2 (que ativa as células T CD4) e nelfinavir podem ativar o vírus latente e inibir a replicação viral.
Propriedades biomiméticas	As nanopartículas podem mimicar algumas entidades biológicas, como anticorpos, recetores, ácidos nucleicos ou proteínas através da ligação aos seus locais funcionais.	Várias nanopartículas têm atividade, intrinsecamente, contra o VIH.

7.1 Nanomateriais com interesse antirretroviral

Tem sido utilizada uma grande variedade de nanomateriais em biomedicina, como nanopartículas, dendrímeros, lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanocápsulas, nanocristais e nanotubos.^{39–45} Contudo, apenas alguns tipos reúnem condições para aplicação na terapêutica do VIH-1 (Tabela 6.2 e Figura 6.1).

Tabela 7.2: Tipos de nanomateriais utilizados na terapêutica do VIH-1 (adaptado).⁸⁶

Tipos de nanomateriais usados na terapêutica do VIH-1	Vantagens	Limitações
<p>Lipossomas Vesículas lipídicas que consistem em bicamadas fosfolipídicas com um centro aquoso, que pode ser utilizado para encapsular fármacos hidrofílicos, enquanto que os fármacos hidrofóbicos e anfílicos podem ser solubilizados na bicamada fosfolipídica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ A rápida clearance da circulação permite a libertação dos fármacos antirretrovirais através de macrófagos. Assim, a eficácia de aprisionamento dos fármacos é maior e, consequentemente, o tempo de semi-vida é maior. ❖ Ideal para administração transdérmica. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ O centro aquoso dos lipossomas tem um pequeno volume, pelo que apresentam fraca capacidade de aprisionar moléculas hidrofílicas. ❖ Estabilidade física e biológica do antirretroviral.
<p>Dendrímeros Apresentam uma estrutura tridimensional seccionada e são sintetizados através da ligação entre várias unidades monoméricas, pelo que apresentam uma baixa polidispersão. O seu centro é multifuncional, pois tem a capacidade de encapsular vários grupos funcionais, apresenta várias camadas interiores e uma superfície multivalente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Propriedades baseadas na superfície multivalente. ❖ As propriedades fisicoquímicas podem ser controladas durante a síntese, controlando os grupos centrais e também a natureza e número de grupos funcionais na superfície. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Baixo índice terapêutico e citotoxicidade.
<p>Nanopartículas Poliméricas Sintéticas Nanopartículas que são preparadas a partir de polímeros sintéticos onde os agentes ativos são dissolvidos e encapsulados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Composição química precisa. ❖ Grande controlo das propriedades físicas, como a taxa de dissociação, permeabilidade e targeting. ❖ Não apresentam impurezas nem toxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Biodegradável.
<p>Nanopartículas Inorgânicas Nanopartículas produzidas através da modificação da superfície de óxidos inorgânicos, com capacidade de ligação a grupos funcionais. Um exemplo deste tipo são as partículas de ouro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Excelentes propriedades eletrónicas, magnéticas e catalíticas. ❖ Dimensões nanométricas e propriedades imagiológicas ajustáveis. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Toxicidade. ❖ Imunogenicidade.
<p>Nanopartículas Poliméricas Naturais Nanopartículas produzidas a partir de polímeros naturais, com capacidade de encapsular os princípios ativos. Os polímeros naturais poderão ser, por exemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Celulose ❖ Alginato ❖ Quitosano 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Capacidade moderada de degradação imunogénica. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Composição física e química muito variável.
<p>Micelas Moléculas anfílicas que se agregam em meio aquoso e formam uma vesícula esférica cujo centro é hidrofóbico, pelo que pode encapsular fármacos hidrofóbicos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ A dissociação lenta permite uma retenção dos fármacos encapsulados por um período mais longo e, eventualmente, alcançar maiores concentrações dos fármacos no seu sítio alvo. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ A absorção e libertação dos fármacos depende da dissociação da micela. ❖ Pode irritar as membranas mucosas.

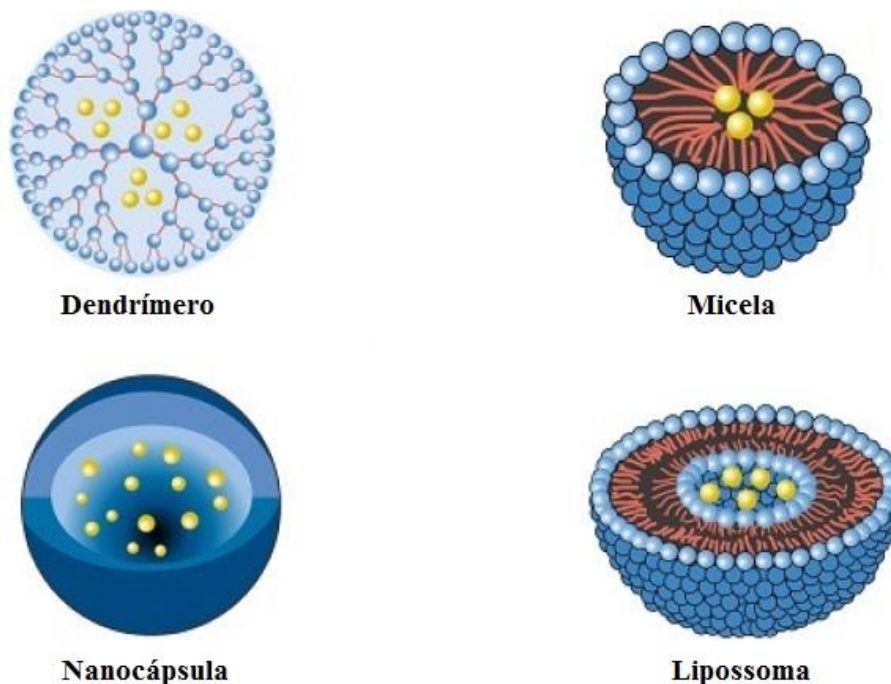


Figura 7.1: Exemplos de nanomateriais (adaptado).⁶

7.2 Barreiras biológicas – o desafio

Os sistemas nanométricos poderão entrar no organismo por várias vias (intravenosa, dérmica, subcutânea, inalatória, intraperitoneal ou oral), e a sua absorção dá-se após a interação com os componentes biológicos, havendo de seguida a distribuição para os vários órgãos. Durante este processo poderão ocorrer várias formas de excreção, os nanomateriais poderão ser metabolizados ou entrar diretamente nas células, havendo o risco dos seus metabolitos ou os próprios nanomateriais permanecerem ao nível intracelular indefinidamente, o que, por conseguinte, acarreta efeitos tóxicos.⁴⁶

Assim, desde o momento da administração até à atividade antiviral, os nanomateriais poderão encontrar várias “barreiras” biológicas⁴⁷⁻⁴⁹, tais como:

- ❖ Degradação enzimática e baixa estabilidade.⁴⁸ Alguns nanomateriais demonstram estabilidade *in vitro* mas não são necessariamente estáveis quando administrados em pacientes;

- ❖ Barreiras epitélio/endotélio, como por exemplo a barreira hemato-encefálica;^{47,49}
- ❖ Barreiras imunológicas, como a opsonização e a ação do sistema reticuloendotelial.⁴⁷ A opsonização leva à agregação das nanopartículas e à ativação dos mecanismos de defesa, como a fagocitose, removendo as nanopartículas da circulação. Como resultado, ocorre a acumulação das mesmas no sistema reticuloendotelial;⁵⁰
- ❖ Barreiras celulares. Os nanomateriais poderão ser incapazes de atravessar a membrana celular;⁴⁸
- ❖ Barreiras extracelulares. Os nanomateriais poderão ser incapazes de penetrar a matriz extracelular;⁴⁸
- ❖ Barreiras intracelulares, como a ação dos endossomas ou das bombas de efluxo das células, que poderão expelir os nanomateriais do meio intracelular.⁴⁹

7.3 Novas abordagens terapêuticas

Os fármacos antirretrovirais inibem a replicação do VIH, sendo que a terapia combinada de pelo menos três fármacos permite diminuir a carga viral e aumentar o número de linfócitos T CD4. Contudo, nem mesmo um tratamento eficaz com os fármacos existentes é capaz de erradicar o vírus, pois, após uma infeção aguda, este consegue estabelecer reservatórios em tecidos que são inacessíveis aos referidos fármacos (reservatórios anatómicos), ou em células onde o vírus permanece latente, sendo que esta forma não é sensível aos fármacos (reservatórios celulares).⁵¹ Os principais reservatórios são:

- ❖ Linfócitos T CD4, contendo vírus latente (reservatório celular);⁵¹
- ❖ Células dendríticas do tecido linfóide (reservatório anatómico);⁵¹
- ❖ Células do sistema retículo endotelial, como células da microglia (cérebro), macrófagos dos alvéolos pulmonares e nódulos linfáticos,

onde não se verifica atividade dos anti retrovirais (reservatório anatómico);⁵¹

- ❖ Tecidos, como o cérebro, onde a penetração dos fármacos é muito baixa, permitindo um nível contínuo de replicação viral (reservatório anatómico).⁵¹

Desta forma, as novas abordagens terapêuticas têm como alvo o sistema reticuloendotelial, o cérebro e o vírus latente contido nos linfócitos T CD4. Existem já várias estratégias em estudo, no sentido de atingir os objetivos acima descritos, como por exemplo:

- ❖ **Otimização das propriedades fisicoquímicas das nanopartículas.** O tamanho e a carga superficial são características com uma influência preponderante na estabilidade, biodistribuição e eficácia da nanopartícula.^{23,52,53} Consoante o tamanho, as nanopartículas poderão conseguir atravessar a barreira endotelial ou serem sequestradas pelo baço, ser eliminadas pelos rins ou ficar presas nos vasos linfáticos. O tamanho das partículas também determina o mecanismo pelo qual entram na célula e em que zona da mesma se localizam, assim como influencia a opsonização das partículas pelas proteínas do plasma.^{50,54} A carga superficial determina se a partícula consegue atravessar a membrana celular, que tem carga negativa (Tabela 6.3);⁴²

Tabela 7.3: Propriedades físicoquímicas dos sistemas nanométricos e implicações em sistemas biológicos.

Propriedade Físicoquímica	Observação
Tamanho < 10 nm	Rápida clearance renal ⁵³
Tamanho < 100 nm	Maior tempo de residência na corrente sanguínea que tamanhos superiores a 100 nm ⁵⁵
Tamanho ≈ 100 nm	Captação celular ⁵⁵
Tamanho >1000 nm	Opsonização pelo sistema reticuloendotelial ⁵⁶
Superfície catiónica	Captação celular ⁵⁷
	Formação de agregados com as proteínas do soro após administração i.v. ⁵³
	Rápida clearance sanguínea e acumulação no fígado e pulmão ⁵⁸

- ❖ **Conjugação com PEG.** O tempo de circulação das partículas pode ser aumentado através da conjugação com o polietilenoglicol (PEG), pois reduz a opsonização e, consequentemente, a fagocitose;⁵⁰
- ❖ **Passagem pela barreira hematoencefálica.** A conjugação das nanopartículas com agentes que inibem os transportadores de efluxo poderá ser a chave para atravessar a barreira hematoencefálica. Os referidos transportadores são responsáveis pelos baixos níveis de penetração no cérebro que alguns antivirais

apresentam. Substâncias como o polímero Pluronic P85 e o Solutol® HS15 bloqueiam a glicoproteína de permeabilidade (P-gp), que é um transportador de efluxo cerebral;^{37,59}

- ❖ **Seletividade.** Os nanofármacos poderão, através de seletividade ativa ou passiva, acumular-se preferencialmente em tecidos ou células específicos. A seletividade passiva ocorre quando os nanofármacos se acumulam nos tecidos lesados devido à permeabilidade aumentada da vasculatura local, por via do processo inflamatório que é desencadeado em vários momentos da infecção por VIH, assim como nos casos de infeções oportunistas. Tal permite que os fármacos atinjam a sua máxima concentração nos seus sítios alvo. Já no caso da seletividade ativa, os nanofármacos contêm ligandos específicos para recetores que se encontram sobreexpressos nos tecidos ou células lesados.⁶⁰

Desta forma, direcionar seletivamente os fármacos até aos reservatórios de VIH seria um benefício bastante significativo pois os fármacos anti retrovirais não conseguem atingir eficazmente estes locais, o que contribui para a persistência e resistência viral.³⁸ As células do sistema reticuloendotelial contêm recetores como HLA-DR determinantes do MHC-II e recetores de lectinas, para os quais poderão ser utilizados anticorpos monoclonais anti HLA-DR, assim como galactose e manose (neste caso para os recetores de lectinas).⁶¹⁻⁶⁴ As células infetadas com VIH expressam à sua superfície a gp120, para a qual poderão ser utilizados ligandos CD4 solúveis ou fragmentos de anticorpos monoclonais anti gp120.⁶⁵⁻⁶⁷

Muitos estudos têm vindo a ser realizados no sentido de encontrar uma formulação que consiga ultrapassar as barreiras anteriormente referidas.

7.3.1 Abordagens em investigação

Em 2014, foi realizado um estudo que implicava a produção de nanopartículas de BSA (do inglês *Bovine Serum Albumine*) e polissorbato 80, para encapsulação de enfavirenz. As partículas produzidas apresentaram as seguintes características:

- ❖ Tamanho = 113,3 nm;
- ❖ Índice de polidispersão $\approx 0,195$;
- ❖ Potencial zeta = -26,5;
- ❖ Eficiência de encapsulação = 71,21%.

Estas partículas, de forma esférica, mostraram ter uma boa capacidade de encapsulação, potencial zeta com capacidade para produzir forças repulsivas interpartícula por forma a evitar a agregação das mesmas e tamanhos bastante homogéneos, a avaliar pelo baixo índice de polidispersão.

Posteriormente, o perfil de libertação das partículas foi avaliado ao longo de 36 horas, *in vitro*, num meio tamponado a pH 7,4. Durante a primeira hora, as partículas libertaram cerca de 22% de efavirenz, sendo que a partir daí observou-se uma libertação sustentada ao longo do tempo, que alcançou cerca de 75% à 36ª hora. As partículas contendo polissorbato 80 demonstraram uma libertação ligeiramente mais retardada comparativamente às partículas que não continham o referido tensioativo. A estabilidade das partículas foi avaliada à temperatura ambiente (25-30°C) e a uma temperatura refrigerada (3-5°C), pelo que demonstraram ter estabilidade química e capacidade de retenção do fármaco em ambas as temperaturas, por um período de 3 meses.

Foram ainda realizados estudos *in vivo*, em ratos albinos adultos, através de administração intravenosa. Verificou-se que as nanopartículas de BSA e polissorbato 80 permitiram obter concentrações de efavirenz mais elevadas em órgãos como o cérebro e nódulos linfáticos, comparativamente às partículas contendo apenas BSA.⁶⁸

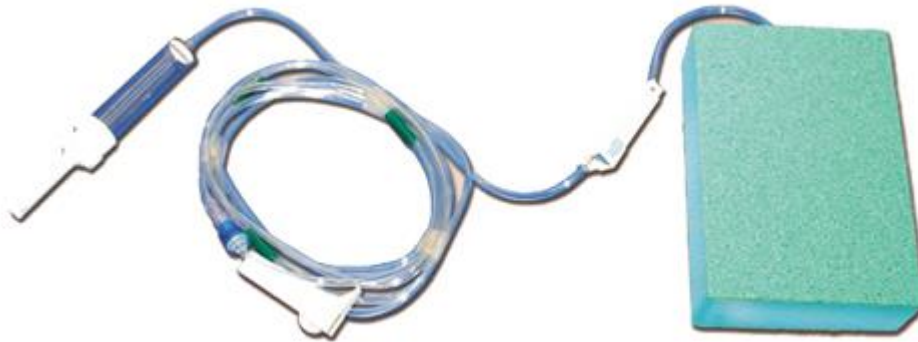
A terapia génica tem vindo a ganhar grande expressão ao longo dos últimos anos na comunidade científica, com aplicabilidade em várias doenças. Neste âmbito, surge o DermaVir, o único produto da nanomedicina que, até à data demonstrou resultados promissores em ensaios clínicos de fase II.⁶⁹ O DermaVir é composto por 2 nanoelementos, o princípio ativo e um polímero que o reveste.

O princípio ativo é uma sequência de ADN plasmídeo (em inglês pDNA) que expressa 15 proteínas do VIH, providenciando assim antigénios para a indução duma resposta imunitária específica contra o VIH. Estas proteínas levam à produção de partículas semelhantes ao vírus (VLP+, do inglês *virus-like particles*). O pDNA foi desenhado por forma a manter a estrutura do VIH *wild-type*, com algumas alterações irreversíveis a nível molecular que previnem a replicação e integração das VLP+. Desta forma, é induzida a resposta imunitária das células T e consequente produção de anticorpos ativos contra os antigénios presentes na superfície do VIH ou substâncias existentes no momento de ligação do vírus às células T. Pretende-se que o pDNA seja expresso nas células dendríticas, pois são estas células que fazem a apresentação dos antigénios, facto essencial para aumentar a resposta imunitária das células T em pessoas infetadas com o VIH.⁷⁰

O pDNA é encapsulado numa cadeia polimérica linear de carga positiva composto por polietilimina manossilada (PEIm), semelhante ao envelope viral. Assim, o PEIm protege o pDNA condensado no seu interior da degradação a nível extra e intracelular. As partículas formadas têm tamanhos compreendidos entre os 70-300nm, potenciais para a endocitose celular, assim como apresentam estabilidade para libertar o pDNA no espaço endossomal e no núcleo.⁶⁹

As nanopartículas com estrutura semelhantes ao vírus são administradas no organismo por via tópica, através dum adesivo semi oclusivo. Contudo, antes da aplicação do adesivo há que fazer a preparação da zona onde este será aplicado, pelo que é recomendada a utilização do DermaPrep®, um dispositivo que se destina à limpeza da pele e feridas, já atualmente utilizado em medicina. Este dispositivo consiste numa esponja esterilizada de dupla face, sendo que uma das faces é suave e a outra é abrasiva,

que é irrigada por uma solução salina (ou apenas por água) através duma válvula que faz a conexão com o reservatório da solução (Figura 6.2).⁷¹ O DermaPrep® consegue quebrar o estrato córneo e, conseqüentemente, vai ativar as células de Langerhans que se encontram na epiderme. A posterior aplicação do adesivo contendo o DermaVir, conduz à captação do princípio ativo que neste se encontra por parte das células de Langerhans já ativas, que atingem a forma de células dendríticas e migram para os



nódulos linfáticos locais (Figura 6.3). Como resultado, é desencadeada a resposta do sistema imunitário, e são produzidas células T efetoras específicas contra o VIH que migram dos nódulos linfáticos para a circulação sistémica e têm a capacidade de eliminar células infetadas com o VIH.⁷⁰

Figura 7.2: DermaPrep®. ⁷²

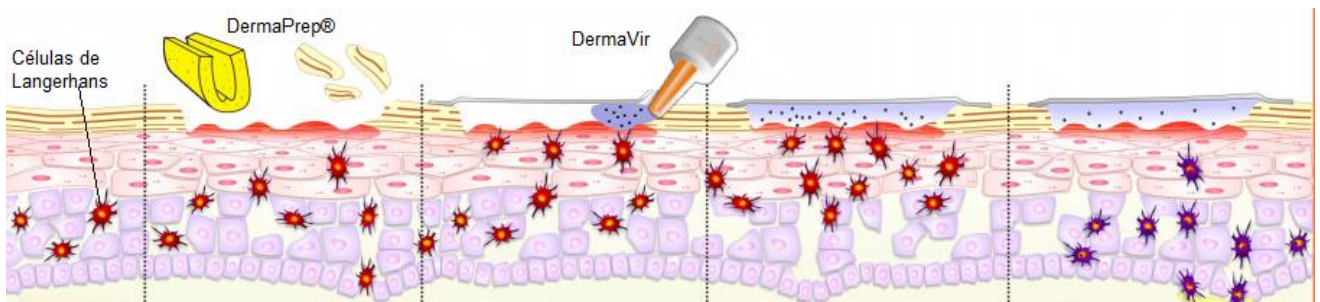


Figura 7.3: Administração do DermaVir (adaptado). ⁸⁷

O DermaVir encontra-se em ensaios clínicos de fase II e tem apresentado resultados bastante promissores. No ensaio de fase I, efetuado em 9 indivíduos infetados com o

VIH a realizar concomitantemente terapêutica anti retroviral, foram administradas doses de 0.1, 0.4 ou 0.8 mg de DermaVir e foram obtidos os seguintes resultados:

- ❖ Reações adversas ao nível da pele pouco significativas, reversíveis e independentes da dose administrada;
- ❖ Capacidade de proliferação de células T VIH-específicas dependente da dose administrada, sendo que o melhor resultado foi obtido com a dose de 0,4mg;
- ❖ Diminuição da frequência de células T VIH-específicas nas 48 semanas posteriores à administração, sugerindo a necessidade de administrações repetida de DermaVir por forma a alcançar uma imunização mais eficaz.⁷³

Num ensaio de fase I/II, realizado em 24 indivíduos infetados com o VIH e a realizar terapêutica anti retroviral concomitantemente, foram realizadas administrações repetidas, durante 3 vezes, de 0.2, 0.4 ou 0.8mg de DermaVir. Seguem-se os resultados obtidos:

- ❖ Igual incidência de efeitos adversos nos pacientes tratados com DermaVir e placebo, sugerindo que o DermaVir é seguro;
- ❖ Maior frequência de células VIH-específicas com a administração de 0,4mg, facto consistente com os resultados obtidos anteriormente.⁷⁴

Num ensaio de fase II foi testada a capacidade de imunização do DermaVir em 36 indivíduos infetados VIH que ainda não se encontravam a realizar terapêutica anti retroviral. Nestes pacientes foram administradas as doses de 0.2, 0.4 ou 0.8mg de DermaVir ou placebo. Os resultados obtidos foram:

- ❖ Reações adversas pouco significativas nos indivíduos que receberam a dose mais baixa, confirmando mais uma vez a segurança do DermaVir em pacientes diferentes;

- ❖ Maior frequência de células VIH-específicas com a administração de 0,4mg, sendo que se verificou uma redução de cerca de 70% do RNA viral, comparativamente com o placebo;
- ❖ Consistência com os estudos prévios, confirmando a segurança e capacidade imunogénica de doses repetidas do DermaVir.⁷⁵

Apesar de bastante promissoras, estas formulações carecem ainda de estudos adicionais que permitam indicar o seu verdadeiro potencial de aplicação na prática clínica.

7.4 Novas abordagens profiláticas

O contacto sexual é o grande fator de transmissão da infeção por VIH. No entanto, apesar de existirem barreiras físicas à transmissão como os preservativos, muitos casais não os utilizam, pelo que este método não tem sido totalmente eficaz.⁷⁶ Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas constitui uma ferramenta fundamental no controlo desta infeção. Contudo, o modelo profilático ideal implica uma série de características que, até à data ainda não foram alcançadas (Figura 6.2).

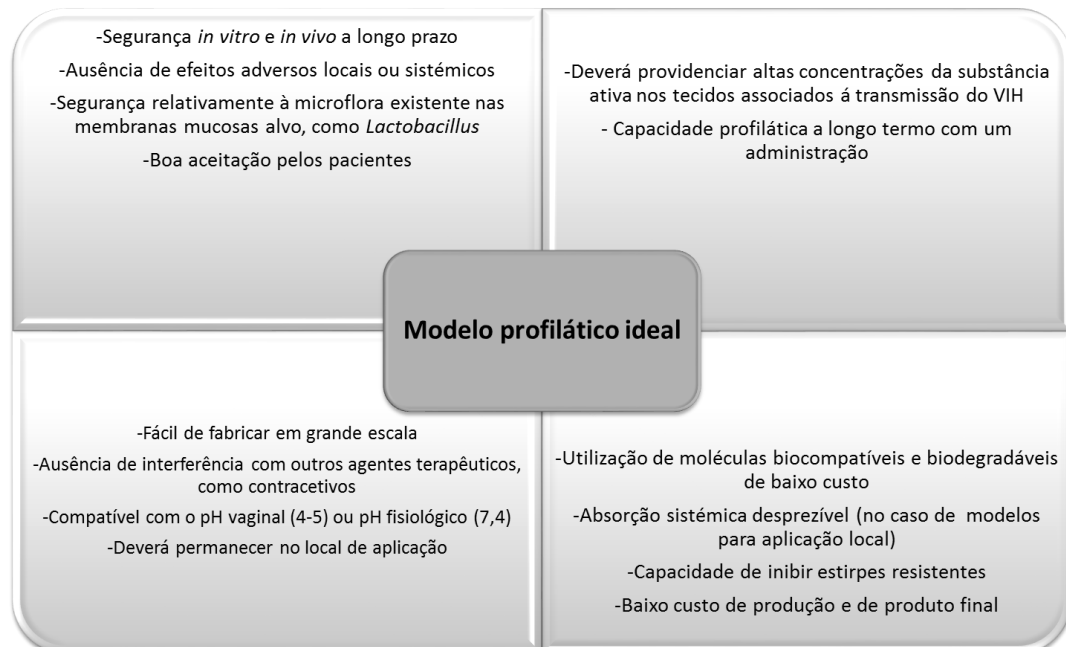


Figura 7.4: Características do modelo ideal para a profilaxia do VIH (adaptado).⁸⁴

Dado que a grande causa da infeção por VIH é a transmissão sexual, as estratégias com capacidade de induzir imunidade na zona da vagina e reto são as mais desejáveis. Neste sentido, os microbicidas, ou seja, produtos químicos aplicados localmente na vagina e/ou reto para prevenir a infeção, têm vindo a ganhar um grande interesse. A nanotecnologia oferece estratégias promissoras quanto à produção de microbicidas, como é o caso do VivaGel®, o único nanomicrobicida que, até à data, entrou em ensaios clínicos em humanos.

O VivaGel® contém um dendrímero, SPL7013 (Figura 6.3), e foi desenvolvido pela Starpharma (Austrália). O SPL7013 contém um centro divalente rodeado por quatro camadas sucessivas de unidades ramificadas de L-lisina, criando um dendrímero com 32 grupos amina à superfície que, via ligação amida, contêm um grupo de sódio 1-(carboximetoxi) naftaleno 3,6-dissulfonato. Esta superfície polianiónica, consegue ligar-se à glicoproteína gp120 existente na superfície do VIH, bloqueando a sua ligação aos recetores CD4 das células humanas. O VivaGel® é então um produto à base de água para aplicação vaginal que contém 3% (m/m) de SPL7013 em Carbopol®. O Carbopol® foi escolhido pois tem na sua base o ácido acrílico, que é um ácido fraco e serve como tampão do pH vaginal. Cumulativamente, o Carbopol® apresenta propriedades mucoadesivas, assim como capacidade de inibição parcial do vírus Herpes Simplex em ratos e do VIH-1 *in vitro*.^{77,78}

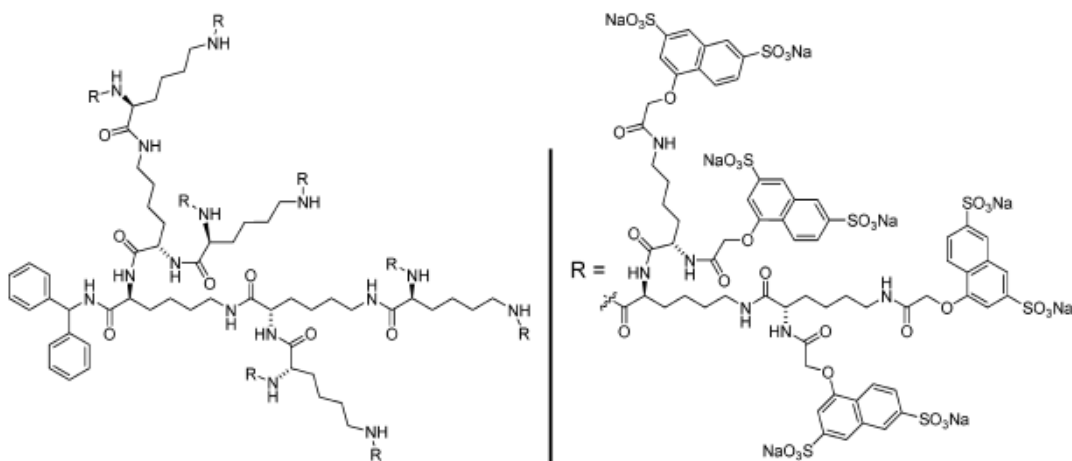


Figura 7.5: Estrutura química do SPL7013.⁷⁸

O VivaGel® encontra-se em estudos clínicos de fase I, onde já provou o seguinte:

- ❖ Segurança e tolerabilidade em mulheres, após 7 dias de administração diária;⁷⁹
- ❖ Boa retenção vaginal e ausência de absorção sistémica;⁷⁹
- ❖ Efeitos adversos geniturinários pouco significativos em 14 dias de aplicação 2 vezes por dia;⁸⁰
- ❖ Atividade contra VIH e vírus herpes simplex durante pelo menos 3 horas após aplicação;⁸¹
- ❖ Alteração do epitélio da mucosa vaginal após o 7º ou 14º dia de administração, situação reversível em 7 dias após descontinuação do tratamento.⁸²

Apesar dos resultados promissores apresentados pelo VivaGel®, há que ter em consideração as alterações observadas após o tratamento ao nível do epitélio da mucosa vaginal que, apesar de reversíveis, poderão indicar citotoxicidade a longo prazo. Estes factos comprovam a necessidade de estudos adicionais.

A par dos microbicidas tópicos, uma vacina ativa contra o VIH tem sido um objetivo profilático extremamente procurado pela comunidade científica nos últimos anos. No entanto, não existem até à data estudos conclusivos das vacinas já estudadas, sendo que os modelos mais promissores falharam nos testes clínicos.^{83,84}

Outros nanomateriais, como lipossomas e nanopartículas poliméricas contêm propriedades que poderão trazer benefícios na profilaxia da infeção por VIH. Contudo, nenhuma formulação utilizando estes materiais provou ser efetiva nos testes pré clínicos e clínicos realizados.⁸⁴

8 Conclusão

A presente monografia teve o intuito de dar a conhecer as atuais estratégias profiláticas e terapêuticas relativamente à infeção por VIH, assim como as perspectivas que os mais recentes estudos nesta área apresentam.

As terapêuticas convencionais da infeção por VIH apresentam inúmeras limitações, como altos níveis de toxicidade, interações com terapêutica concomitante que, impreterivelmente, diminuem a adesão dos doentes à terapêutica.

Cumulativamente, não existe até à data uma terapêutica capaz de erradicar efetivamente a infeção, uma vez que o vírus se aloja em reservatórios celulares e anatómicos, inacessíveis às terapêuticas atualmente existentes.

A nanotecnologia poderá trazer inovações importantes às terapêuticas convencionais, podendo vir a permitir a encapsulação de fármacos, por forma a que estes consigam alcançar os reservatórios anatómicos do VIH, assim como conseguir a libertação de substâncias ativas nos locais onde este se encontra em estado latente.

Atualmente, os únicos produtos da nanotecnologia aplicados a esta temática com resultados promissores em ensaios clínicos em humanos são o DermaVir e o VivaGel®. O DermaVir poderá ser aplicado no tratamento da infeção por VIH e já provou ser seguro e providenciar imunização eficaz contra o vírus, em administrações repetidas ao longo do tempo. Por sua vez, o VivaGel® poderá revolucionar as estratégias profiláticas relativamente ao VIH, pois até à data mostrou efetividade contra o vírus, baixa toxicidade e a possibilidade de ser aplicado 3 horas antes do coito.

Qualquer tratamento capaz de erradicar o VIH em pacientes já infetados ou de providenciar uma nova e eficaz estratégia profilática terá uma enorme oportunidade comercial. A nanotecnologia oferece oportunidades para desenvolver novas estratégias de tratamento e profilaxia da infeção por VIH. No entanto, para que estas estratégias tenham impacto na saúde pública, caso se verifiquem passíveis de aplicar na prática clínica, terão de melhorar substancialmente a saúde dos pacientes infetados por VIH, a

um custo semelhante ou mais baixo que as atuais estratégias anti retrovirais. A sofisticação necessária à produção e desenvolvimento a larga escala destas estratégias poderá aumentar muito significativamente o preço ao consumidor final, facto que poderá condicionar a aplicação prática e à larga escala das novas estratégias ao nível da nanotecnologia, ainda que provem ser eficazes e seguras. O desenvolvimento de sistemas para aplicação tópica, como é o caso do DermaVir e do VivaGel®, são uma promessa no que concerne à redução dos custos associados, uma vez que poderão evitar a necessidade de equipas especializadas para proceder à administração dos mesmos, assim como dispensar uma possível internalização dos pacientes a nível hospitalar.

9 Referências Bibliográficas

1. Seeley, R., Stephens, T., & Tate P. *Anatomia E Fisiologia*. McGraw-Hill Companies; 2003.
2. World Health Organization. Prevalence of HIV among adults aged 15 to 49 (%). 2013. Available at: http://apps.who.int/gho/athena/data/download.xsl?format=xml&target=GHO/MDG_0000000029&profile=excel&filter=COUNTRY:*;REGION:AFR;REGION:AMR;REGION:SEAR;REGION:EUR;REGION:EMR;REGION:WPR.
3. Departamento de Doenças Infecciosas (INSA). *Infeção VIH / SIDA : A Situação Em Portugal a 31 de Dezembro de 2012*. (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA I, ed.). Lisboa; 2013.
4. Programa de luta contra a SIDA/IST tuberculose e lepra. Protocolo de Terapêutica Anti-Retroviral. 2004:1-48.
5. National Centre for AIDS and STD control. National Anti-retroviral Therapy Guidelines. 2009.
6. Parboosing R, Maguire GEM, Govender P, Kruger HG. Nanotechnology and the treatment of HIV infection. *Viruses*. 2012;4(4):488-520. doi:10.3390/v4040488.
7. Jino JA, Smith AA. Preparation and evaluation of stavudine loaded chitosan nanoparticles. *J Pharm Res*. 2013;6(2):268-274.
8. Boyapalle S, Mohapatra S, Mohapatra S. Nanotechnology Applications to HIV Vaccines and Microbicides. *J Glob Infect Dis*. 2012;4(1):62-8. doi:10.4103/0974-777X.93764.
9. Narashimhan L, Sharma S, Sethuraman S. Biochimica et Biophysica Acta Evaluation of chitosan nanoformulations as potent anti-HIV therapeutic systems. *BBA - Gen Subj*. 2014;1840(1):476-484. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.002.
10. Brunton L L, Blumenthal D K, Murri N, Dandan R H KBC. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011:Chap. 50.
11. Earl L a, Lifson JD, Subramaniam S. Catching HIV “in the act” with 3D electron microscopy. *Trends Microbiol*. 2013;21(8):397-404.
12. Ashish. Conformational rearrangement within the soluble domains of the CD4 receptor is ligand-specific. *J Biol Chem*. 2008;283:2761-2772.

13. SuperCalBiologicistic. Replicação do VIH. Available at: <http://supercalibiologicistic.wordpress.com/tag/hiv>.
14. World Health Organization. CONSOLIDATED GUIDELINES ON THE USE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTION. 2013;(June).
15. Marsden MD, Zack J a. Eradication of HIV: current challenges and new directions. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(1):7-10. doi:10.1093/jac/dkn455.
16. INFARMED. *Prontuário Terapêutico 11*. (INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I/ M de S, ed.). Tipografia Rainho & Neves, Lda; 2012.
17. Collins S. *Mudanças de Tratamento Quando O Tratamento Anti-Retroviral Falha: Terapêutica de Segunda E Terceira Linha E Resistências Aos Medicamentos*. GAT - Grup. Lisboa: Abbott Laboratórios,Lda; 2008.
18. Longe, Jacqueline L, co-aut. / Jeryan, Christine, co-aut. / Blanchfield, Deirdre S. C, Gispert, Carlos, dir. / Nunes, Ana, trad. / Brito, Filomena, trad. / Guerreiro, Inês T. *Manual de Medicinas Complementares*. (Oceano, ed.). Barcelona; 2014.
19. Administração Regional de Saúde do Algarve. Centro de Aconselhamento e Detecção Precoce da Infecção VIH/SIDA (CAD). *Ministério da Saúde*. Available at: <http://www.arsalgarve.min-saude.pt/portal/?q=node/>. Accessed August 1, 2014.
20. Ministério da Saúde; Associação Nacional das Farmácias. Kit prevenção SIDA: Relatório Anual. 2010.
21. World Health Organization. *Responding to Intimate Partner Violence and Sexual Violence against Women: WHO Clinical and Policy Guidelines*. Italy; 2013.
22. Picraux T. *Encyclopaedia Britannica Deluxe Edition*. Chicago; 2010.
23. Goldberg M et al. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym*. 2011;17(11):1-26.
24. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):425-33. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.005.
25. Williams D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials*. 2008;29(12):1737-8. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.003.
26. United States National Nanotechnology Initiative. Nanotechnology 101: What is it and how it works. Available at: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what>.

27. Yezhelyev M V, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan RM. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7(8):657-667.
28. Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg D a. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):341-50. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.068.
29. Caruthers SD, Wickline S a, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(1):26-30. doi:10.1016/j.copbio.2007.01.006.
30. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine.* 2008;4(4):273-282.
31. Hauck TS, Giri S, Gao Y, Chan WCW. Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4-5):438-48. doi:10.1016/j.addr.2009.11.015.
32. Wong HL, Chattopadhyay N, Wu XY, Bendayan R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4-5):503-17. doi:10.1016/j.addr.2009.11.020.
33. Das Neves J, Amiji MM, Bahia MF, Sarmiento B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4-5):458-77.
34. Gupta U, Jain NK. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4-5):478-90. doi:10.1016/j.addr.2009.11.018.
35. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations{,} imaging{,} diagnostics{,} therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009;38(6):1759-1782. doi:10.1039/B806051G.
36. Nowacek A. NIH Public Access NanoART, neuroAIDS and CNS drug delivery. *Nanomedicine (Lond).* 2010;4(5):557-574. doi:10.2217/nnm.09.38.NanoART.
37. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(8):915-28. doi:10.1016/j.addr.2007.05.017.
38. Vyas TK, Shah L, Amiji MM. Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006;3(5):613-628. doi:10.1517/17425247.3.5.613.

39. Peixuan G. RNA Nanotechnology: Engineering, Assembly and Applications in Detection, Gene Delivery and Therapy. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;5(12):1964-1982.
40. Pedziwiatr-Werbicka E, Ferenc M, Zaborski M, Gabara B, Klajnert B, Bryszewska M. Characterization of complexes formed by polypropylene imine dendrimers and anti-HIV oligonucleotides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;83(2):360-6. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.008.
41. Lee CC, MacKay JA, Frechet JMJ, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotech*. 2005;23(12):1517-1526.
42. Couvreur P, Stella B, Reddy LH, et al. Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano Lett*. 2006;6(11):2544-8. doi:10.1021/nl061942q.
43. Fu A, Gu W, Boussert B, et al. Semiconductor quantum rods as single molecule fluorescent biological labels. *Nano Lett*. 2007;7(1):179-82. doi:10.1021/nl0626434.
44. Liong M, Lu J, Kovochich M, et al. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. 2009;2(5):889-896. doi:10.1021/nn800072t.Multifunctional.
45. Lee JE, Lee N, Kim H, et al. Uniform Mesoporous Dye-Doped Silica Nanoparticles Decorated with Multiple Magnetite Nanocrystals for Simultaneous Enhanced Magnetic Resonance Imaging , Fluorescence Imaging , and Drug Delivery. 2010:552-557.
46. Fischer HC, Chan WCW. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18(6):565-71. doi:10.1016/j.copbio.2007.11.008.
47. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):161-171.
48. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2101-41. doi:10.1021/mp200394t.
49. Sanhai WR, Sakamoto JH, Canady R, Ferrari M. Seven challenges for nanomedicine. *Nat Nano*. 2008;3(5):242-244.
50. Aggarwal P, Hall JB, Mcleland CB, Dobrovolskaia MA, Mcneil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;61(6):428-437. doi:10.1016/j.addr.2009.03.009.Nanoparticle.
51. Clarke JR, White NC, Weber JN. HIV Compartmentalization: Pathogenesis and Clinical Implications. *Permanyer Publ*. 2010;61:15-22.

52. Petros R a, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-27. doi:10.1038/nrd2591.
53. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008;5(4):505-515.
54. Karmali PP, Simberg D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(3):343-357. doi:10.1517/17425247.2011.554818.
55. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:1-16. doi:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.
56. Moghimi SM, Hunter a C, Andresen TL. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:481-503. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623.
57. Li S, Huang L. reviews Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008.
58. Thiagarajan G, Greish K, Ghandehari H. Charge affects the oral toxicity of poly(amidoamine) dendrimers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(2):330-4. doi:10.1016/j.ejpb.2013.01.019.
59. Spitzenberger TJ, Heilman D, Diekmann C, et al. ANTIRETROVIRAL THERAPY IN ANIMAL MODEL FOR HIV-1. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;27(5):1033-1042. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600414.NOVEL.
60. Pereira de Oliveira M, Garcion E, Venisse N, Benoît J-P, Couet W, Olivier J-C. Tissue Distribution of Indinavir Administered as Solid Lipid Nanocapsule Formulation in mdr1a (+/+) and mdr1a (-/-) CF-1 Mice. *Pharm Res.* 2005;22(11):1898-1905. doi:10.1007/s11095-005-7147-6.
61. Gagné J-F, Désormeaux A, Perron S, Tremblay MJ, Bergeron MG. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558(2):198-210.
62. Dutta T, Jain NK. Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly (propyleneimine) dendrimer. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2007;1770(4):681-686. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.12.007.
63. Garg M, Asthana A, Agashe HB, Agrawal GP, Jain NK. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity, tissue distribution and pharmacokinetics. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(5):605-616. doi:10.1211/jpp.58.5.0005.

64. Garg M, Garg BR, Jain S, et al. Radiolabeling, pharmacoscintigraphic evaluation and antiretroviral efficacy of stavudine loaded 99mTc labeled galactosylated liposomes. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33(3):271-281. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2007.12.006>.
65. Flasher D, Konopka K, Chamow SM, et al. Liposome targeting to human immunodeficiency virus type 1-infected cells via recombinant soluble CD4 and CD4 immunoadhesin (CD4-IgG). *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1994;1194(1):185-196. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90219-4](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(94)90219-4).
66. Pollock S, Dwek R a, Burton DR, Zitzmann N. N-Butyldeoxynojirimycin is a broadly effective anti-HIV therapy significantly enhanced by targeted liposome delivery. *AIDS.* 2008;22(15):1961-9. doi:10.1097/QAD.0b013e32830efd96.
67. Clayton R, Ohagen A, Nicol F, et al. Sustained and specific in vitro inhibition of HIV-1 replication by a protease inhibitor encapsulated in gp120-targeted liposomes. *Antiviral Res.* 2009;84(2):142-149. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.08.003>.
68. Jenita JL, Chocalingam V, Wilson B. Albumin nanoparticles coated with polysorbate 80 as a novel drug carrier for the delivery of antiretroviral drug-Efavirenz. *Int J Pharm Investig.* 2014;4(3):142-8. doi:10.4103/2230-973X.138348.
69. Nátz E, Lisziewicz J. Rational Design of Formulated DNA Vaccines: The DermaVir Approach. In: Thalhamer J, Weiss R, Scheiblhofer S, eds. *Gene Vaccines SE - 6*. Springer Vienna; 2012:127-143. doi:10.1007/978-3-7091-0439-2_6.
70. Lisziewicz J, Tóke ER. Nanomedicine applications towards the cure of HIV. *Nanomedicine.* 2013;9(1):28-38. doi:10.1016/j.nano.2012.05.012.
71. Ltd. 4Med. DermaPrep instructions for use. :6805231. Available at: http://www.4med.co.il/pics/content/DermaPrep_Instructions_For_Use_English.pdf.
72. DermaPrep. Available at: http://www.4med.co.il/Products/Derma_Prep/. Accessed September 19, 2014.
73. Lisziewicz J, Bakare N, Calarota S a, et al. Single DermaVir immunization: dose-dependent expansion of precursor/memory T cells against all HIV antigens in HIV-1 infected individuals. *PLoS One.* 2012;7(5):e35416. doi:10.1371/journal.pone.0035416.
74. B. Rodriguez, D. Asmuth, R. Matining, J. Spritzler, X.-D. Li, J. Jacobson, S. Read, J. Lisziewicz, F. Lori, R. Pollar for the AST. Repeated-dose transdermal administration of dermavir, a candidate plasmid DNA-based therapeutic HIV vaccine, is safe and well-tolerated: a 61-week analysis of ACTG study 5176. 2010.

75. Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. 2012:411-422.
76. Morris GC, Lacey CJN. Microbicides and HIV prevention: lessons from the past, looking to the future. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(1).
77. Rupp R, Rosenthal SL, Stanberry LR. VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):561-6.
78. McCarthy TD, Karellas P, Henderson S a, et al. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm.* 2005;2(4):312-8. doi:10.1021/mp050023q.
79. O'Loughlin J, Millwood IY, McDonald HM, Price CF, Kaldor JM, Paull JR a. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SPL7013 gel (VivaGel): a dose ranging, phase I study. *Sex Transm Dis.* 2010;37(2):100-4. doi:10.1097/OLQ.0b013e3181bc0aac.
80. McGowan I, Gomez K, Bruder K, et al. Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel (VivaGel) in sexually active young women (MTN-004). *AIDS.* 2011;25(8):1057-64. doi:10.1097/QAD.0b013e328346bd3e.
81. Price CF, Tyssen D, Sonza S, et al. SPL7013 Gel (VivaGel®) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One.* 2011;6(9):e24095. doi:10.1371/journal.pone.0024095.
82. Moscicki A, Kaul R, Yifei MA, et al. Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% SPL 7013 gel (VivaGel®) to assess expanded safety. 2013;59(2):134-140. doi:10.1097/QAI.0b013e31823f2aeb.Measurement.
83. Watkins I. D et al. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med.* 2013;14(6):617-621. doi:10.1038/nm.f.1759.Nonhuman.
84. Date A a, Destache CJ. A review of nanotechnological approaches for the prophylaxis of HIV/AIDS. *Biomaterials.* 2013;34(26):6202-28. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.012.
85. Organization of the HIV-1 virion. Available at: <http://web.archive.org/web/20041119131214/http://w>.
86. Law W, Reynolds JL, Yong K. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. *Int J Nanomedicine.* 2012:5301-5314.
87. Lunzen J Van, Pollard R, Stellbrink H-U, et al. DermaVir for initial treatment of HIV-infected subjects demonstrates preliminary safety, immunogenicity and HIV-RNA reduction versus placebo immunization. *Genet Immun.* 1-25.

