EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NANOTECNOLOGIA NA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS NA TERAPÊUTICA DO HIV

Trabalho submetido por
Ecaterina Catalina Motoc
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro de 2024

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NANOTECNOLOGIA NA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS NA TERAPÊUTICA DO HIV

Trabalho submetido por
Ecaterina Catalina Motoc
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Isabel Henriques Dias Fernandes Pinto

Fevereiro de 2024

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero expressar o meu agradecimento à minha orientadora, professora Ana Isabel Fernandes, pelo apoio, ajuda, compreensão e muita paciência.

Obrigada a toda a equipa do Hospital Garcia da Horta pelo estágio e aprendizagens que vieram com ele.

Obrigada ao Grupo 24, à Dra. Daniela Gomes e Dra. Marina Cunha pelo excelente estágio e conhecimento transmitido, contribuindo para a profissional que sou hoje.

Aos meus colegas e professores que estiveram presentes neste percurso académico.

À minha muito querida amiga e colega de trabalho, Beatriz, pela força que me transmitiste quando queria desistir, pela ajuda independentemente da hora a que fosse e pela amizade.

Ao Gonçalo, que começou este percurso comigo e ainda hoje continua ao meu lado, a apoiar, compreender e cuidar. Sem ti, esse percurso teria sido muito mais difícil e nada igual!

E por fim à minha mãe, nada disto seria possível sem todo o apoio, suporte e amor que ao longo destes anos todos me deste incondicionalmente. Um obrigado nunca será suficiente para agradecer tudo o que fizeste por mim.

Resumo

Um dos maiores desafios enfrentados atualmente é a busca pela cura da infeção causada pelo vírus da imunodeficiência adquirida. Os reservatórios virais associados ao HIV representam um obstáculo significativo no tratamento, permitindo a persistência do vírus no organismo, mesmo durante a terapêutica antirretroviral. Esses reservatórios são locais onde o vírus permanece num estado latente apesar da terapêutica, tornando a erradicação completa do HIV uma tarefa desafiadora.

Embora existam diversas terapias disponíveis no mercado para mitigar as condições mais severas da infeção e melhorar as taxas de sobrevivência, essas abordagens enfrentam limitações relacionadas com a biodisponibilidade, permeabilidade reduzida e curta semivida dos medicamentos. A toxicidade, efeitos adversos e a resistência do vírus a vários fármacos são barreiras adicionais que as terapias atuais precisam superar.

Nanossistemas de veiculação baseados em nanotecnologia, como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas inorgânicas e orgânicas, oferecem uma maneira de direcionar os medicamentos aos tecidos e órgãos-alvo. A inclusão de antirretrovirais em nanossistemas demonstrou potencial para melhorar a libertação dos medicamentos e otimizar os seus perfis farmacocinéticos.

No entanto, a aplicação da nanotecnologia no tratamento da infeção por HIV enfrenta o desafio de atingir efetivamente os reservatórios virais nos pacientes. Isso pode ser influenciado por fatores como a distribuição heterogênea desses reservatórios e as barreiras biológicas que dificultam sua veiculação. A compreensão desses obstáculos é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes que possam ser bem-sucedidas no contexto clínico.

Palavras-chave: Nanotecnologia; HIV; Nanopartículas; Reservatórios virais; Antirretrovirais.

Abstract

One of the greatest challenges currently faced is the quest for a cure for the infection caused by the human immunodeficiency virus (HIV). Viral reservoirs associated with HIV pose a significant obstacle to treatment, allowing the virus to persist in the body even during antiretroviral therapy. These reservoirs are regions where the virus remains in a latent state, making the complete eradication of HIV a challenging task.

While various therapies are available in the market to mitigate the most severe conditions of the infection and improve survival rates, these approaches face limitations related to drug bioavailability, reduced permeability, and short half-life. Toxicity, adverse effects, and the virus's resistance to multiple drugs are additional barriers that current therapies need to overcome.

Nanocarrier-based nanotechnology systems, such as liposomes, solid lipid nanoparticles, inorganic, and organic nanoparticles, offer a way to target medications to tissues and organs. The inclusion of antiretrovirals in nanosystems has shown potential to enhance drug release and optimize their pharmacokinetic profiles.

However, the application of nanotechnology in the treatment of HIV infection faces the challenge of effectively reaching viral reservoirs in patients. This may be influenced by factors such as the heterogeneous distribution of these reservoirs and biological barriers that hinder their delivery. Understanding these obstacles is crucial for developing effective strategies that can be successful in a clinical context.

Keywords: Nanotechnology; HIV; Nanoparticles; Viral reservoirs; Antiretrovirals.

Índice

Agradecimentos **5**

Resumo **1**

Abstract **3**

Índice de Figuras **7**

Índice de Tabelas **9**

Abreviaturas **11**

Introdução **13**

1.Epidemiologia **15**

1.1 Enquadramento **15**

1.2. Reservatório viral **16**

2.Terapêutica antirretroviral **21**

2.1. Limitações e vantagens da terapêutica antirretroviral **22**

3.Nanotecnologia – novas abordagens à veiculação de fármacos antirretrovirais **25**

3.1. Nanopartículas lipídicas **26**

3.1.1. Lipossomas 26

3.1.2. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) 28

3.2. Nanopartículas inorgânicas **30**

3.2.1. Nanopartículas de prata 30

3.2.2. Nanopartículas de ouro 32

3.2.3. Nanopartículas de sílica e carbono 33

3.2.4. *Quantum dots* 33

3.3. Nanopartículas orgânicas **35**

3.3.1 Nanopartículas poliméricas 35

3.3.1.1. Ácido poli(lático-co-glicólico) 37

3.3.1.2. Alginato 40

3.3.1.3. Quitosano 42

4. Conclusões e perspetivas futuras 45

5. Bibliografia 47

Índice de Figuras

Figura 1. Processo de formação do reservatório latente do HIV 17
Figura 2. Ilustração esquemática dos maiores reservatórios celulares e anatómicos do HIV 18
Figura 3. Principais órgãos e tecidos de reservatório viral. 19
Figura 4. Lipossoma e Nanopartícula Lipídica Sólida 29
Figura 5. Mecanismo esquemático da atividade antiviral das nanopartículas de prata em diferentes fases da replicação do vírus 31
Figura 6. Nanopartículas de ouro revestidas com múltiplas cópias de um ligando com sulfato terminal inibem in vitro a infeção pelo HIV em células T 33
Figura 7. Representação gráfica da captura/imagem do HIV usando a técnica de imagem de dupla coloração e imagens fluorescentes com aumento 100x a partir das partículas de HIV usando a técnica de imagem de dupla coloração, Qdot525/anticorpo..... 34
Figura 8. Quantidade acumulada libertada vs tempo para nanopartículas à base de polimetilmetacrilato-PEG carregadas com medicamentos antirretrovirais (Raltegravir: ϵ = 8,15–31,28 μg; Nevirapina: ϵ = 7,5–36,84 μg; Lamivudina: ϵ = 1,20–3,59 μg; e Zidovudina: ϵ = 2..... 36
Figura 9. Quantidade acumulada libertada vs tempo para nanopartículas à base de policaprolactona-PEG carregadas com fármacos antirretrovirais (Raltegravir: ϵ = 6,31–30,2 μg; Nevirapina: ϵ = 6,7–57 μg; Lamivudina: ϵ = 0,14–4,71 μg; e Zidovudina: ϵ = 0,56–37,46 μg..... 36
Figura 10. (A) Macrófagos em branco; (B) Nanopartículas de Mn-PLGA marcadas com FITC; (C) Nanopartículas de PLGA marcadas com FITC. Ampliação 500× 38
Figura 11. Nanoformulação à base de PLGA carregada com C-Dots e DRV.. 39
Figura 12. Avaliação da capacidade do DRV de atravessar o modelo in vitro da barreira hematoencefálica. Os valores são médios ± desvio padrão (n = 3 replicados; teste t de Student; ** = $p < 0,001$). 40
Figura 13. Encapsulação de zidovudina em nanopartículas conjugadas de alginato revestidos PF-68 para veiculação de fármacos anti-HIV 41

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação e exemplos dos fármacos antirretrovirais contra HIV, suas vantagens e desvantagens 22
Tabela 2. Nanotransportadores e TARV associada 44

Abreviaturas

3TC – Lamivudina
ABC – Abacavir
AgNPs – Nanopartículas de Prata
ARV – Antirretroviral
AuNPs – Nanopartículas de Ouro
AZT – Zidovudina
BHC – Barreira Hematoencefálica
BIC – Bidegravir
CdTe – Telureto de Cádmio
CdSe – Semicondutor Inorgânico
CMD – Dextrano Carboximetilado
CV – Carga Viral
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DRV – Darunavir
DTG – Dolutegravir
FTC – Emtricitabina
GALT – Tecido Linfóide associado ao intestino
HBV – Vírus da Hepatite B
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
II – Inibidor Integrase
INTRs – Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídicos
INNTR – Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídico
IP – Inibidor Protease
LNs – Gânglios Linfáticos
NK – *Natural Killer*
NP – Nanopartículas
NPIs – Nanopartículas Inorgânicas
NPOs – Nanopartículas Orgânicas
OMS – Organização Mundial da Saúde
PEI – Polietilenimina
PLGA – Ácido poli(lático-co-glicólico)
RAL – Raltegravir
RNA – Ácido Ribonucleico
SLN – Nanopartículas sólidas
SNC – Sistema Nervoso Central
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TARV – Terapêutica Antirretroviral
TAF – Tenofovir Alafenamida
TDF – Tenofovir Disoproxil Fumarato

Introdução

Quando os primeiros casos de infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, ou HIV (da sigla inglesa correspondente a *Human Immunodeficiency Virus*), foram detetados, a patologia revelou-se letal e desprovida de alternativas terapêuticas viáveis (Tseng et al., 2015). Na atualidade, a cura permanece inexistente, sobretudo devido à presença do vírus em tecidos que funcionam como reservatórios virais. Ao longo dos anos, foram aprovados diversos medicamentos, dirigidos a alvos terapêuticos distintos para diversificar as estratégias terapêuticas. Os tratamentos convencionais envolvem agora uma combinação de vários fármacos que visam diferentes fases do ciclo de replicação do vírus. Apesar de a terapia antirretroviral combinada ser eficaz na redução da carga viral para níveis indetetáveis, ela não está isenta de desvantagens, tais como efeitos adversos significativos, frequência de administração e a possibilidade de resistência devido à elevada taxa de mutação do HIV (Deeks et al., 2014).

Neste contexto, novos fármacos encontram-se atualmente em fase de testes para o controlo da infeção. Para além dos novos medicamentos pertencentes às classes terapêuticas já conhecidas, estão também em ensaios clínicos novas classes de fármacos, dirigidos a novos alvos e apresentando mecanismos de ação distintos. No que diz respeito à administração de fármacos, estão a ser efetuados esforços para modificar a via de administração de alguns antirretrovirais convencionais no sentido de superar alguns problemas relacionados com a adesão à terapêutica como a complexidade dos regimes terapêuticos combinados, os efeitos secundários provocados pelo tratamento, por parte dos doentes (Cillo et al., 2014). O curto tempo de semi-vida dos fármacos administrados oralmente resulta na necessidade de doses elevadas de antirretrovirais, requerendo múltiplas administrações diárias. Outra desvantagem da administração oral é o efeito de primeira passagem ao qual os fármacos estão sujeitos, traduzindo-se a uma baixa biodisponibilidade (Sosnik & Augustine, 2016) .

A nanotecnologia apresenta uma abordagem inovadora para ultrapassar obstáculos de formulação, nomeadamente a baixa solubilidade dos fármacos. A encapsulação de antirretrovirais em nanossistemas tem-se revelado igualmente promissora no controlo da libertação dos fármacos e na melhoria do seu perfil farmacocinético Yildirimer et al., 2011).

Com o presente trabalho pretende-se rever a situação atual no que concerne à utilização da nanotecnologia na prevenção e terapêutica da doença provocada pelo HIV.

Para tal, efetuou-se uma revisão bibliográfica, em diversas bases de dados, nomeadamente *PubMed, b-ON, Science Direct, Biomed Central,* e *Cochrane Library,* usando como critério de seleção dos artigos o limite temporal dos últimos dez anos. Pontualmente e sempre que pertinente pela relevância, incluem-se artigos mais antigos.

1. Epidemiologia

1.1 Enquadramento

Desde o início da epidemia de HIV/SIDA, 84 milhões de pessoas foram infetadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e cerca de 40 milhões de pessoas morreram da doença (Global HIV Programme, 2022).

No final de 2016, cerca de 36,7 milhões de pessoas, em todo mundo, estavam infetadas pelo HIV e aproximadamente 1 milhão de mortes relacionadas foram registadas. Em 2022, o número de pessoas infetadas aumentou para 39 milhões, enquanto o número de mortes relacionadas diminuiu para 630 000 mil, espelhando os avanços no tratamento entretanto feitos.

Dos 39 milhões de infetados, a região africana contribuiu com cerca de 25,6 milhões de casos WHO 2023. A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu novas metas (95-95-95) a atingir até 2030, significando que 95% da população infetada com o vírus deve ter conhecimento disso, 95% da população infetada ser tratada com terapêutica antirretroviral (TARV) e 95% dos que recebem TARV devem ter carga viral (CV) indetetável, *i.e.*, CV < 50 cópias/ml de sangue (EACS, 2023).

Os HIV-1 e HIV-2 partilham aproximadamente 40 a 50% de homologia genética e têm a sua origem num grupo de vírus distribuídos por várias espécies de macacos e chimpanzés. A epidemia de infeção por HIV-1 e HIV-2 é o resultado de transmissões virais cruzadas do macaco para o Homem, representando desta forma infeções zoonóticas. No entanto, os HIV-1 e HIV-2 desenvolvem quadros epidemiológicos diferentes, o que pode ser explicado pelo facto de as transmissões ocorreram em ocasiões e locais geográficos distintos.

O HIV-1 é o mais prevalente a nível mundial, enquanto a infeção pelo HIV-2 se encontra restrita à Guiné-Bissau e países da África Ocidental (Taveira et al., 2014).

Atendendo ao elevado número de pessoas infetadas anualmente, é imperativo uma melhoria dos meios disponíveis para o tratamento pelo HIV.

A comunidade científica tem vindo a desenvolver sistemas terapêuticos avançados para a prevenção, diagnóstico e tratamento das infeções provocadas pelo HIV, não só no sentido de reduzir o número de novas infeções, mas também de conseguir melhorar a qualidade de vida das pessoas infetadas.

Efetivamente, com a introdução da terapêutica antirretroviral proporcionou-se uma melhoria da qualidade de vida e consequentemente uma diminuição da mortalidade em pessoas infetadas pelo vírus.

O HIV continua a replicar-se em níveis muito baixos, mesmo com uma TARV eficaz. Verificou-se que ocorre uma infeção persistente dos linfócitos T em pacientes com CV não detetável e com sucesso terapêutico (Laird et al., 2015).

1.2. Reservatório viral

Após infeção, o vírus HIV escapa ao sistema imunitário de diversas formas, sendo a mais prevalente a formação de reservatórios virais latentes (Chen et al., 2022; Theys et al., 2018).

HIV-1 é um retrovírus que se replica no genoma das células do hospedeiro, principalmente nas células T CD4+ de memória. Estas células integram o DNA proviral em latência durante aproximadamente 44 meses (Bruner et al., 2015).

Pensa-se que o reservatório se forma durante a fase aguda da infeção, mas ainda não se conseguiu determinar com precisão onde e como o reservatório se forma. O reservatório do vírus tem uma vida útil longa e não responde bem ao tratamento antirretroviral, resultando numa infeção crónica e no retorno do vírus quando a TARV é interrompida (Pedro et al., 2019).

Os linfócitos T-CD4+ ativados, quando são infetados pelas partículas virais do HIV, têm a capacidade de retornar ao seu estado de memória em repouso como parte de seu processo fisiológico intrínseco após a resolução da resposta imune ao antigénio. Isso culmina na formação de um reservatório latente do vírus dentro dessas células (Bruner et al., 2015).

O pro-vírus latente encontra-se predominantemente em diferentes subconjuntos de células naïve. As células T CD4+ memória em repouso são em grande parte não

permissivas para a expressão de genes virais, e o genoma viral persiste na forma de DNA como um pro-vírus integrado que não é transcrito (Ruelas & Greene, 2013).

Por esta razão, as células latentes infetadas não são alvo do sistema imunitário nem da terapêutica antirretroviral (Theys et al., 2018). O reservatório latente que se encontra nas células T CD4+ memória é amplamente reconhecido como uma das principais barreiras para a erradicação do HIV-1.

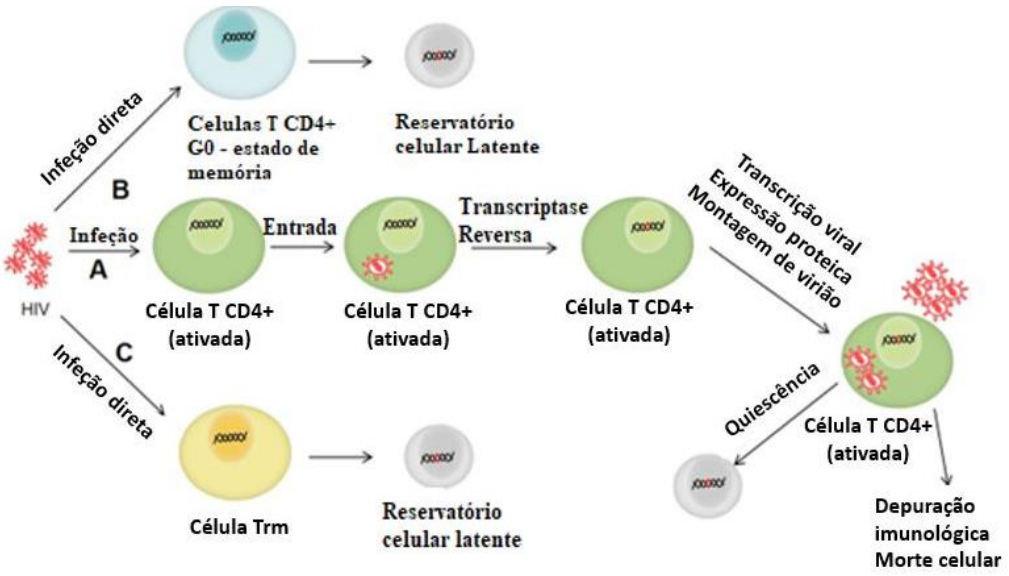

Figura 1. Processo de formação do reservatório latente do HIV adaptado de Chen, (2022)

Na Figura 1 sumariza-se o processo de formação do reservatório latente do HIV: (A) o HIV infeta principalmente os linfócitos T CD4+. Quando entra na célula, o RNA é primeiro transcrito em DNA do HIV, que é então incorporado no DNA das células T CD4+. Algumas células T CD4+ com DNA do HIV integrado entram num estado de repouso, e o HIV nessas células T CD4+ em repouso torna-se latente; (B) o HIV infeta diretamente células T CD4+ que revertem para um estado de memória inativo G0, permitindo assim que o vírus entre em latência; (C) o HIV estabelece uma incubação ao infetar diretamente células T CD4+ de memória em repouso (células Trm) (Thomas et al., 2019).

O estabelecimento e a manutenção da infeção latente podem ser influenciados por vários fatores, incluindo a disponibilidade de fatores de transcrição do hospedeiro,

modificações epigenéticas, defeitos na proteína Tat do HIV, locais e direções de integração, e mecanismos regulatórios pós-transcricionais (Chen et al., 2022).

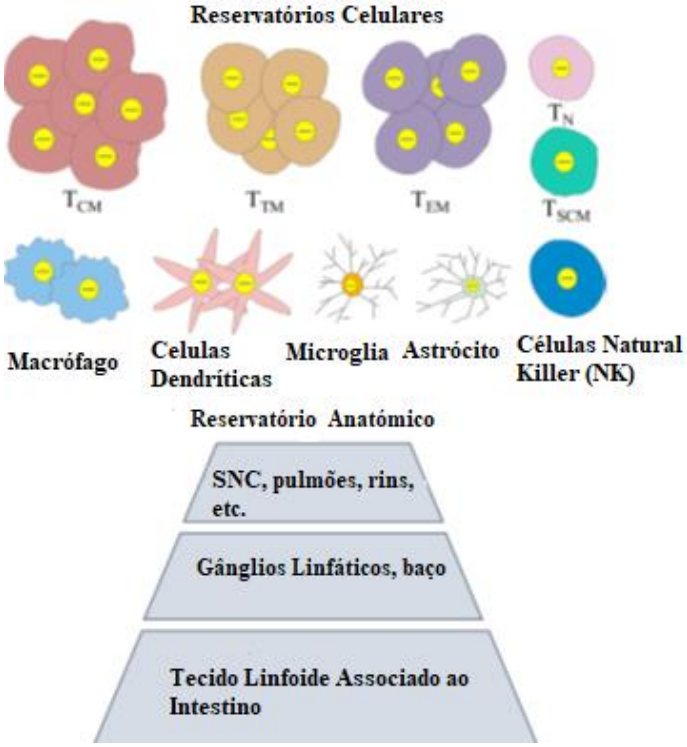

Figura 2. Ilustração esquemática dos maiores reservatórios celulares e anatómicos do HIV, de Cao Woodrow, (2019).

A Figura 2 representa os principais reservatórios celulares e anatómicos do HIV. Conforme referido anteriormente, os reservatórios são locais no organismo onde o vírus se pode esconder e persistir mesmo durante a terapêutica antirretroviral. A dimensão dos reservatórios na ilustração é proporcional ao tamanho dos compartimentos que os representam.

Na figura representa-se também os diferentes tipos de células T CD4+, bem como outras células e tecidos, envolvidos na infeção pelo HIV:

- T CM (células T CD4+ de memória central)
- T TM (células T CD4+ de memória de transição)
- T EM (células T CD4+ de memória efetora)
- T N (células T CD4+ não ativas)
- T SCM (células estaminais de memória T CD4+)

- Célula NK (célula assassina natural)
- SNC (sistema neural central)
- LNs (gânglios linfáticos)
- GALT (tecido linfoide associado ao intestino)

A autópsia em humanos revelou a presença do provírus do HIV em vinte e oito tecidos, incluindo fígado, baço, trato genital e cérebro, conforme ilustrado na Figura 3 (Chandra et al., 2021). Várias células importantes do reservatório, como células T CD4+ de memória em repouso, células dendríticas, macrófagos e microglia, estão amplamente distribuídas nesses tecidos (Honeycutt et al., 2017). Alguns dos locais estudados são chamados de locais de refúgio, protegidos da penetração da terapia antirretroviral (como o cérebro e os testículos), representando desafios adicionais para os tratamentos do HIV (Fletcher et al., 2014).

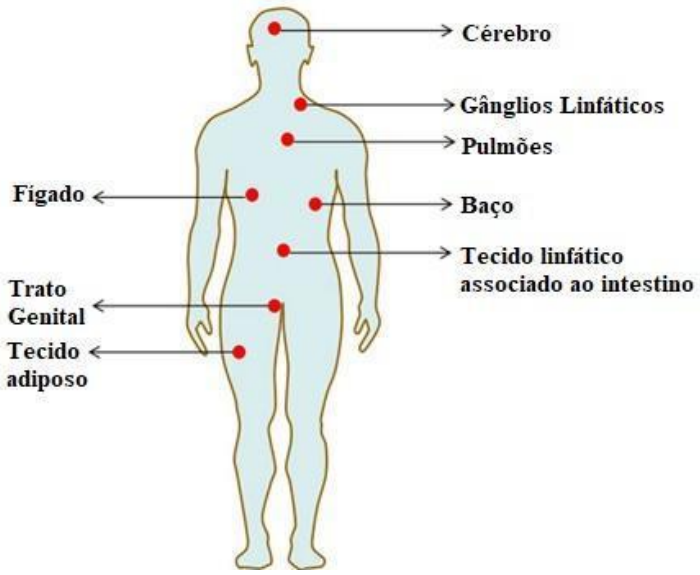

Figura 3. Principais órgãos e tecidos de reservatório viral de Chen et al. (2018).

2. Terapêutica antirretroviral

É recomendado iniciar a terapêutica antirretroviral (TARV) para todos os indivíduos com HIV, independentemente da contagem das células CD4, com o objetivo de reduzir a morbilidade e a mortalidade associadas à infeção pelo HIV e para prevenir a transmissão do vírus (ensaios START e TEMPRANO, estudo HPTN 052, Estudo PARTNER). As evidências mostram que começar a TARV no mesmo dia do diagnóstico da infeção pelo HIV é viável e aceitável para indivíduos recém-diagnosticados (EACS Guidelines 12.0, 2018).

Um regime antirretroviral (ARV) para um paciente naïve consiste em dois inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTRs) administrados em combinação com um terceiro fármaco ARV ativo de uma das três classes de antirretrovirais: um inibidor da integrase (II), um inibidor não nucleosídico (INNTR) ou um inibidor da protease (IP) com um potenciador farmacocinético (os dois fármacos usados para esse fim são o cobicistat e o ritonavir).

Os regimes da terapêutica antirretroviral recomendados em adultos e adolescentes naïve (What to Start: Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient | NIH, 2023) são:

- Bictegravir (BIC) /tenofovir alafenamide (TAF)/emtricitabina (FTC)
- Dolutegravir (DTG) /abacavir (ABC) /lamivudina (3TC) - apenas para indivíduos HLA-B*5701 e hepatite B (HBV) negativos
- Dolutegravir + (emtricitabina ou lamivudina) + (tenofovir alafenamide ou tenofovir disoproxil fumarato)
- Dolutegravir/lamivudina, exceto para indivíduos com >500.000 cópias/mL, coinfecção por HBV, ou quando a TAR é iniciada antes dos resultados do teste de resistência genotípica do HIV para a transcriptase reversa ou testes de HBV estarem disponíveis
- Raltegravir (RAL) + (emtricitabina ou lamivudina) + (tenofovir alafenamida [TAF] ou tenofovir disoproxil fumarato [TDF]).

2.1. Limitações e vantagens da terapêutica antirretroviral

Na Tabela 1, são apresentados exemplos de fármacos antirretrovirais de diversas classes usados na terapêutica do HIV, juntamente com as suas vantagens e limitações.

Tabela 1. Classificação e exemplos de fármacos antirretrovirais contra HIV, suas vantagens e desvantagens

Classe e Alvo Terapêutico	Fármacos Aprovados	Vantagens	Desvantagens	Ref.
INTRs Transcriptase Reversa	(TNF) (ABC) (3TC) (FTC)	Tempo de semivida intracelular longo Elevada biodisponibilidade oral Poucas interações medicamentosas	Altamente propenso a resistências Efeitos adversos: mielossupressão, náuseas, vómitos	(Zulfiqar et al., 2017a)
INNTR Transcriptase Reversa (replicação viral)	Bictegravir	Mais seletivos do que INTRs Produção mais barata	Altamente propenso a resistência Efeitos Adversos: *rash* cutâneo, vómitos, fatiga, alterações de humor, depressão, conjuntivite	(Kemnic & Gulick, 2022) (Zulfiqar et al., 2017b)
II Integrase Viral (Integração do ADN)	(DTG) (RAL)	Fármacos seletivos	Reações de hipersensibilidade Efeitos Adversos: *rash* cutâneo, náusea, vómitos, diarreia, perda de apetite	(Arts & Hazuda, 2012) (Zulfiqar et al., 2017b)
IP Protease Viral (Síntese Proteica)	(RTV) (NFV)	Ativo contra HIV-1 e HIV-2	Alta prevalência de resistência Efeitos Adversos: a**rritmia**, pirose, fatiga, tonturas, dor abdominal	(Siegfried et al., 2011)

Antagonistas CCR5 Co-recetor CCR5	Maraviroc	Eficaz em casos de resistência à terapêutica convencional	Eficaz apenas em vírus R5 Efeitos Adversos: náuseas, diarreia, fadiga, enxaqueca	(Van Der Ryst, 2015)

Diversas estratégias para a cura ou gestão da doença provocada pelo HIV enfrentam obstáculos e limitações que reduzem a sua eficácia clínica. Uma das restrições mais imperativas para o tratamento do HIV é a escassez de adesão aos regimes terapêuticos de fármacos antirretrovirais combinados (cART). No que diz respeito à formulação, a fraca biodisponibilidade, alta citotoxicidade, maior efeito de primeira passagem e clearance renal dos fármacos (Joshy et al., 2018).

- Baixa biodisponibilidade oral

Apesar dos notáveis progressos alcançados na terapêutica antirretroviral, esta depara-se com várias dificuldades. Ainda que a via oral de antirretrovirais seja de fácil administração, o fármaco administrado sofre metabolismo de primeira passagem significativo pela via oral. Dependendo da zona de absorção no organismo a biodisponibilidade varia amplamente (60-90%) (Kumar et al., 2015). A presença de proteínas de efluxo resistentes no trato gastrointestinal, como a glicoproteína P, afetam a biodisponibilidade oral e a concentração do fármaco no Sistema Nervoso Central (SNC)(Ginat et al., 2023). A forte afinidade com proteínas observada na maioria dos fármacos antirretrovirais impede a sua difusão através da Barreira Hematoencefálica (BHE), diminuindo ainda mais a biodisponibilidade (Abadi et al., 2022).

A resistência aos fármacos antirretrovirais é outro fator significativo. A replicação do HIV é um processo rápido e propenso a mutações (todos os dias, são geradas 10 mil milhões de partículas virais), resultando em pelo menos uma mutação por genoma. Essas alterações genéticas permitem que o vírus adquira resistência aos medicamentos antirretrovirais, especialmente quando é utilizada a monoterapia (Kumar et al., 2015). A resistência aos fármacos está a tornar-se mais comum, e os pacientes infetados correm o risco de adquirir uma estirpe de HIV resistente.

- Terapêutica a longo-prazo

Apesar da significativa redução da morbidade e mortalidade associadas à SIDA devido à terapêutica antirretroviral, é imperativo garantir um tratamento contínuo, administrar fármacos de diferentes classes para evitar o desenvolvimento continuo de resistência (Pennings et al,. 2013). Adicionalmente, o consumo prolongado de antirretrovirais em indivíduos com HIV aumenta a probabilidade de desenvolver comorbidades relacionadas com o envelhecimento, problemas metabólicos e a toxicidade associada à administração a longo prazo destas terapêuticas (Rugemalila et al., 2021). As dificuldades na adesão tornam-se uma complicação, sendo frequentemente problemáticas (Yavuz et al., 2018). Os fármacos antirretrovirais não têm impacto nos reservatórios virais, como os macrófagos, mesmo após o início do tratamento antirretroviral, tornando a erradicação um desafio extremamente difícil (Sarma et al., 2020).

- Toxicidade da TARV

A TARV pode apresentar uma ampla gama de efeitos adversos, desde uma pequena e auto-limitada intolerância até complicações potencialmente fatais. Pode ser desafiador diferenciar problemas relacionados com o HIV e reações adversas da terapêutica antirretroviral. As toxicidades mais comuns da TARV incluem toxicidade mitocondrial, hipersensibilidade, lipodistrofia, dislipidemia e diabetes tipo 2 (Damiri et al., 2022).

A acidose láctica, a toxicidade hepática, a pancreatite e a neuropatia periférica são todos sintomas de disfunção mitocondrial causada por medicamentos NRTI (Sornsuwan et al., 2021). A lipodistrofia e outras anomalias metabólicas são mais familiares com os inibidores de protease (IP) e em menor grau com outros NRTI, especialmente a estavudina. Certas anomalias do tecido adiposo parecem estar associadas a esta classe mais antiga da TARV (Sornsuwan et al., 2021). Reações alérgicas, incluindo erupções cutâneas e reações de hipersensibilidade, são outra toxicidade comum da TAR, frequentemente observada com INNRTIs (Guaraldi et al., 2013), mas também podem ocorrer com NRTIs, como abacavir (ABC).

3. Nanotecnologia – novas abordagens à veiculação de fármacos antirretrovirais

A nanotecnologia lida com o design, produção e aplicação de materiais à nanoescala. A utilização da nanotecnologia surgiu como uma abordagem promissora à cura do HIV devido às inúmeras vantagens que apresenta e que permitem fazer face às limitações discutidas no capítulo anterior (Kumar et al., 2015) .

Uma das maiores vantagens da sua utilização neste contexto é a capacidade de encapsular diversos agentes, o que permite coadministração de vários fármacos, usando um único sistema de transporte, ou nanopartícula (Blanco et al., 2015). Adicionalmente, as nanopartículas conseguem aumentar o tempo de circulação dos fármacos no sangue e nos tecidos, o que permite ao fármaco manter-se durante mais tempo no organismo havendo, assim, uma maior probabilidade de atingir o alvo terapêutico (Bañó et al., 2020).

Outra das vantagens da nanotecnologia, é permitir uma libertação prolongada e controlada dos fármacos, atingindo um nível terapêutico mais sustentado. As nanopartículas podem ainda ser modificadas para chegarem a células ou tecidos específicos, essa particularidade de vetorização ativa é hoje já amplamente utilizada em terapias oncológicas (Shao et al., 2016).

Diversas nanopartículas têm sido estudadas na TARV para conseguir uma libertação controlada dos fármacos, incluindo lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas, dendrímeros e nanopartículas inorgânicas (Shao et al., 2016). Estes sistemas e suas TARV encontram-se resumidos na tabela 2.

3.1. Nanopartículas lipídicas

Nanopartículas lipídicas têm atividade antivírica contra o HIV apesar de certas limitações (Mobarakeh et al., 2019a). NP lipídicas mais utilizadas são representadas por lipossomas e NP lipídicas sólidas (SLN). As nanopartículas sólidas representam uma resposta aos desafios enfrentados na terapêutica antirretroviral, abordando questões como a limitada solubilidade aquosa, semi-vida reduzida e penetração ineficaz nos reservatórios virais do HIV.

3.1.1. Lipossomas

Os lipossomas são partículas esféricas coloidais compostas por fosfolípidos e moléculas de colesterol que encapsulam um reservatório aquoso (Figura 4). O tamanho de um lipossoma vária entre 25 nm e 10 μm (Bruner et al., 2015).

Existem três tipos de lipossomas: vesículas pequenas unilamelares, vesículas grandes unilamelares e vesículas multilamelares. Os lipossomas interagem de várias formas com a superfície celular. Primeiramente, ocorre a troca lipídica, facilitando a transferência de moléculas lipídicas entre os lipossomas e as membranas celulares. Em segundo lugar, a adsorção difunde-se através da membrana celular, liberando a substância encapsulada dentro do lipossoma. Em terceiro lugar, os lipossomas podem transferir o seu conteúdo encapsulado para a membrana celular por fusão (Sailaja et al., 2021). No entanto, os lipossomas penetram na célula através do processo de endocitose (Chopra et al., 2013).

Os lipossomas têm a capacidade encapsular fármacos hidrofóbicos nas suas bicamadas lipídicas ou fármacos hidrofílicos no interior do seu núcleo aquoso, melhorando a solubilidade e a estabilidade do fármaco. Os lipossomas conseguem ser formulados para libertar fármacos de forma controlada, permitindo a libertação sustentada do fármaco no local alvo e reduzindo a frequência de administração, sendo esta uma grande vantagem que este sistema apresenta (Bulbake et al., 2017).

Na encapsulação de fármacos, o uso de lipossomas pode potenciar a sua biodisponibilidade, melhorando a sua eficácia e reduzindo os efeitos secundários. Os sistemas de veiculação de fármacos lipossomais podem também permitir a terapêutica combinada, onde múltiplos fármacos podem ser encapsulados dentro do mesmo

lipossoma, possibilitando efeitos sinérgicos, simplificando os regimes de tratamento (Chen et al., 2018), melhorando assim a adesão terapêutica.

Algumas limitações: baixa capacidade de encapsulação, em particular para moléculas lipofílicas que ficam aprisionadas na dupla camada de fosfolípidos, estabilidade moderada e libertação precoce de agentes ativos hidrofílicos para a corrente sanguínea.

Os lipossomas têm sido estudados para uma utilização como um sistema de administração de vacinas contra o HIV, potenciando as respostas humorais contra os trímeros de envelope do HIV (Bale et al., 2017). Os lipossomas que apresentam uma elevada densidade de trímeros do envelope podem vir a desencadear respostas humorais (Tokatlian et al., 2018).

A zidovudina é um inibidor da transcriptase reversa que é um fármaco anfifílico, carregado em lipossomas, resulta em melhorias significativas nas propriedades farmacocinéticas e distribuição nos tecidos, incluindo níveis mais elevados de distribuição no sistema retículo-endotelial e no cérebro, maior tempo de semi-vida médio e menor clearance média em comparação com a solução convencional de zidovudina. Portanto, a abordagem de lipossomas pró-fármaco pode conduzir a uma redução da toxicidade e a uma eficácia aprimorada da terapêutica anti-HIV baseada em zidovudina (Shibata et al., 2013).

A análise de biodistribuição de nanopartículas lipídicas contendo darunavir revelou uma captação significativamente aumentada nos reservatórios do HIV, nomeadamente no baço e no cérebro (Singh et al., 2014).

Lipossoma carregado com AZT também revelou uma melhoria na captação nos órgãos linfoides. Foi observada uma localização significativa do fármaco nos tecidos linfoides com as nanopartículas lipídicas associadas ao indinavir (Kumar et al., 2015). Sistemas de Liberação Nanométrica (SLN) de efavirenz evidenciaram uma quantidade substancial de efavirenz no baço, um órgão linfático crucial para um melhor controlo da infeção pelo HIV (Gaur et al., 2014).

3.1.2. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são outro género de nanopartícula de base lipídica, estas compostas por lípidos sólidos (Saravanan et al., 2021). Os principais agentes ativos hidrofóbicos ou hidrofílicos podem ser inseridos, respetivamente, nas bicamadas lipídicas ou no compartimento aquoso. A atoxicidade e biocompatibilidade destes sistemas coloidais torna-os interessantes para aplicações *in vivo* (Saravanan et al., 2021).

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são estruturadas em volta de um núcleo lipídico (Figura 4), normalmente baseado em triglicéridos biodegradáveis, bioassimiláveis e não tóxicos. Os tamanhos destas partículas variam entre 50 nm e 1μm (Iranpur et al., 2019).

A matriz lipídica é sólida à temperatura ambiente e à temperatura do corpo humano liquefaz-se. Esta matriz, mais ou menos cristalizada, é estabilizada por uma camada de tensioativos e os lípidos utilizados são ou triglicerídeos altamente purificados, ou misturas de glicerídeos ou ceras. Estas partículas possuem estabilidade e uma capacidade de encapsulação de moléculas lipofílicas maior do que os lipossomas. Podem também ser sintetizadas na ausência de um solvente orgânico.

As nanopartículas lipídicas sólidas têm sido consideradas como uma abordagem para ultrapassar os desafios farmacodinâmicos e farmacocinéticos relacionados com a terapêutica antirretroviral. Estes desafios incluem questões como uma solubilidade aquosa limitada, meia-vida curta e penetração ineficiente nos reservatórios virais do HIV. São biocompatíveis, têm uma boa aderência as células, e podem melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do princípio ativo por meio de diferentes vias de administração ao encapsularem fármacos hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos, apresentando uma grande eficiência de encapsulação (Faria et al., 2021).

As nanopartículas lipídicas, para além da sua capacidade de encapsular fármacos, também demonstram a capacidade de interagir com a proteína gp120 localizada na superfície externa do vírus, resultando no impedimento da entrada do HIV nas células CD4. Além disso, estas nanopartículas têm a capacidade de obstruir os recetores CD4 em células imunitárias específicas, prevenindo assim a entrada do HIV nessas células. Dessa forma, apresentam uma atividade antiviral (Faria et al., 2019).

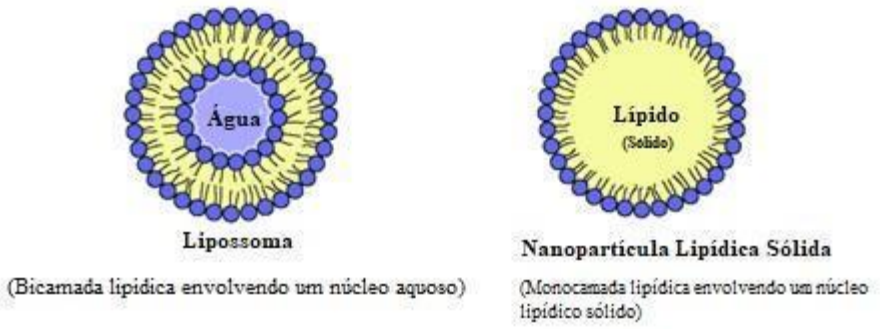

Figura 4. Lipossoma e Nanopartícula Lipídica Sólida

No entanto, estas estruturas apresentam um conjunto de desvantagens (Cao & Woodrow, 2019) como:

a) Estabilidade limitada – suscetíveis à degradação e instabilidade, levando a uma potencial fuga de fármaco ou à redução do prazo de validade do medicamento.

b) Processo de fabrico complexo – A produção requer equipamento especializado e especialização de recursos humanos, tornando-se um processo complexo e demorado.

c) Risco de toxicidade – apesar de consideradas seguras, ainda existe um potencial de toxicidade associado à sua utilização. É importante selecionar cuidadosamente os componentes lipídicos e otimizar a sua formulação para minimizar quaisquer efeitos adversos.

d) Desafios na produção em escala – Aumentar a escala pode representar um desafio, uma vez que manter a qualidade e a reprodutibilidade consistentes torna-se mais difícil com tamanhos de lote maiores.

e) Capacidade limitada de encapsulação do fármaco – Podem existir limitações em termos da quantidade de fármaco que pode ser carregado na nanopartícula, o que pode afetar a eficácia terapêutica e os requisitos de dosagem.

f) Resposta imunitária – como sistemas de partículas, têm o potencial de induzir uma resposta imunitária no organismo, o que pode afetar a sua segurança e eficácia.

g) Considerações de custo – A produção e formulação podem ser dispendiosas, o que pode limitar a sua ampla utilização e acessibilidade.

h) Desafios regulamentares – O processo de aprovação regulamentar como sistemas de veiculação de fármacos pode ser complexo e demorado, exigindo testes e documentação extensos para garantir a segurança e eficácia.

3.2. Nanopartículas inorgânicas

O efeito antiviral das nanopartículas inorgânicas no HIV busca explorar o potencial dessas partículas para combater a infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. Várias classes de nanopartículas inorgânicas têm sido investigadas devido às suas propriedades únicas e à capacidade de interagir com o HIV em diferentes fases do seu ciclo de vida (Correa et al., 2021).

3.2.1. Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata (AgNPs) são os metais inorgânicos nanoformulados mais eficazes contra as infeções virais. A eficácia do tratamento com estas partículas já foi testada para o HIV-1, *Herpes Simplex Virus* (HSV), Norovírus, Vírus da influenza (H7N3) e Vírus de Coxsackie, (Kerry et al., 2019). Demonstrou-se que os catiões de prata libertados pelas nanopartículas de prata interagem diretamente com grupos de fósforo e enxofre de biomoléculas, como o DNA e o RNA.

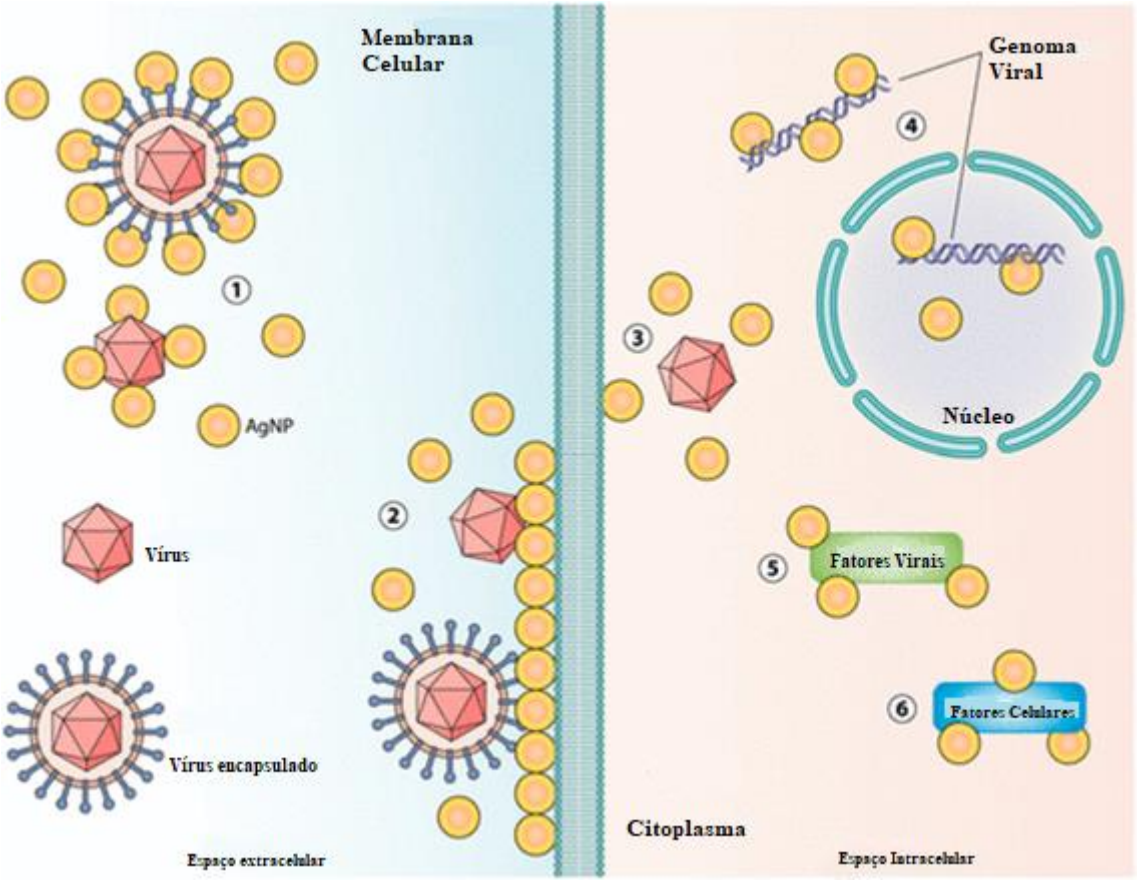

Figura 5. Mecanismo esquemático da atividade antiviral das nanopartículas de prata em diferentes fases da replicação do vírus de Kerry et al. (2019).

O mecanismo antiviral das nanopartículas de prata (Figura 5) pode resultar da interferência destas com o ciclo de replicação viral em diferentes fases, como a ligação do vírus à membrana celular e a sua entrada na célula, a síntese de proteínas, bem como a replicação do DNA e do RNA. Além disso, foi descrito que as AgNPs impediram a entrada do HIV, em células suscetíveis, ao interagir com glicoproteínas da cápsula do HIV, impedindo a sua ligação e fusão com a membrana celular (Milovanovic et al., 2017).

Apesar das nanopartículas de prata terem demonstrado potencial na atividade antiviral do HIV, existem algumas limitações à sua utilização. Uma desvantagem é o potencial de citotoxicidade. Com efeito, as nanopartículas de prata podem induzir toxicidade celular, o que limita a sua aplicação terapêutica. Adicionalmente, a dosagem ideal e o método de veiculação de nanopartículas de prata para o tratamento do HIV estão ainda a ser explorados. Mais pesquisas são necessárias para determinar a via de administração mais eficaz e segura (Kurd et al., 2019).

3.2.2. Nanopartículas de ouro

Ao contrário das AgNPs, as nanopartículas de ouro (AuNPs) raramente foram utilizadas pela sua atividade antiviral direta. O seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da ligação da gp120 ao CD4, o que resulta na inibição da entrada viral, interrompendo a replicação numa fase pós-entrada, maioritariamente associada à transcrição no interior da célula hospedeira (Saravanan et al., 2021).

Di Gianvincenzo et al. (2010), descreveram que as AuNPs com ligandos contendo iões sulfato terminais, atuam como agentes anti-HIV ao ligarem-se à glicoproteína gp120 do vírus, resultando na inibição da infeção *in vitro* pelo HIV em células T, conforme se observa na Figura 6.

A semelhança das nanopartículas de prata, uma preocupação é a estabilidade e a biocompatibilidade das nanopartículas de ouro. Os efeitos a longo prazo e a acumulação potencial de nanopartículas de ouro no corpo precisam de ser mais investigados.

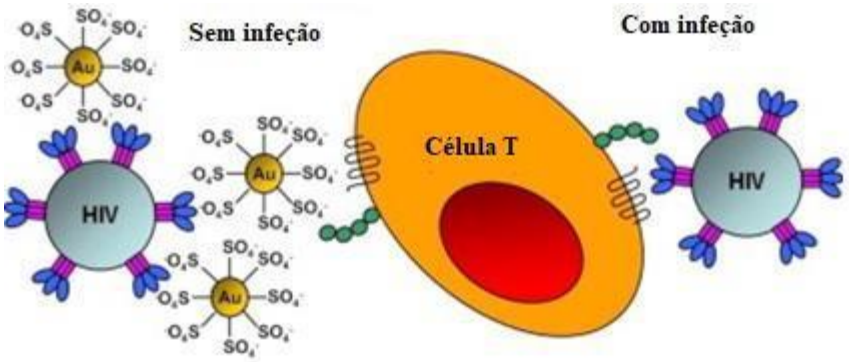

Figura 6. Nanopartículas de ouro revestidas com múltiplas cópias de um ligando com sulfato terminal inibem in vitro a infeção pelo HIV em células T. Adaptado de Di Gianvincenzo et al (2010).

3.2.3. Nanopartículas de sílica e carbono

Atualmente, a eficácia antiviral das nanopartículas de sílica (SiNPs) é comprovada contra o HIV, Papilomavírus, Circovírus suíno, HBV (vírus da hepatite B) e HSV (vírus *Herpes simplex*). O mecanismo mais investigado acerca da atividade antiviral é através da imunização do hospedeiro contra o vírus e da inibição da ligação viral (De Souza E Silva et al., 2016.

Martinez et al. (2019), relataram uma atividade antiviral eficaz de derivados de fulereno durante a replicação viral do HIV-1 em células T CD4+ humanas num ensaio *in vitro* (Dong et al., 2017).

As nanopartículas de sílica e carbono (Macchione et al., 2020) apresentam desvantagens tais como: (a) investigação limitada sobre a potencial toxicidade e efeitos a longo prazo da sílica e das nanopartículas de carbono no tratamento do HIV/SIDA; (b) desafios na obtenção de uma cinética ótima de carregamento e libertação de fármacos; (c) potencial imunogenicidade e respostas inflamatórias associadas ao seu uso.

3.2.4. *Quantum dots*

Os *quantum dots* funcionam como semicondutores com dimensões entre 2 e 10 nm. Os *quantum dots* podem apresentar-se como materiais com um componente único e composições internas uniformes como, por exemplo, CdTe e PbS, ou consistir num núcleo de semicondutor inorgânico e com um revestimento para melhorar as propriedades óticas, podendo apresentar fluorescência quando estimulados pela luz (Dong et al., 2017).

Os *quantum dots* têm demonstrado um papel significativo como nanotransportadores para veiculação de fármacos antivirais (Aftab et al., 2019).

A barreira hematoencefálica (BHC) possui um recetor de transferrina que pode ser explorado como mecanismo de veiculação ativa, *i.e.* mediado por recetor. Num estudo *in vitro*, a transferrina foi conjugada a *quantum dots* e, posteriormente, carregados com um fármaco antiviral, o saquinavir. A nanoformulação obtida demonstrou uma capacidade significativa de atravessar um modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica, além de uma redução considerável na replicação viral do HIV-1 em células mononucleares infetadas do sangue periférico (Saravanan et al., 2021). Dado as suas propriedades, os *quantum dots* estão a ser cada vez mais usados como biossensores para deteção de vírus.

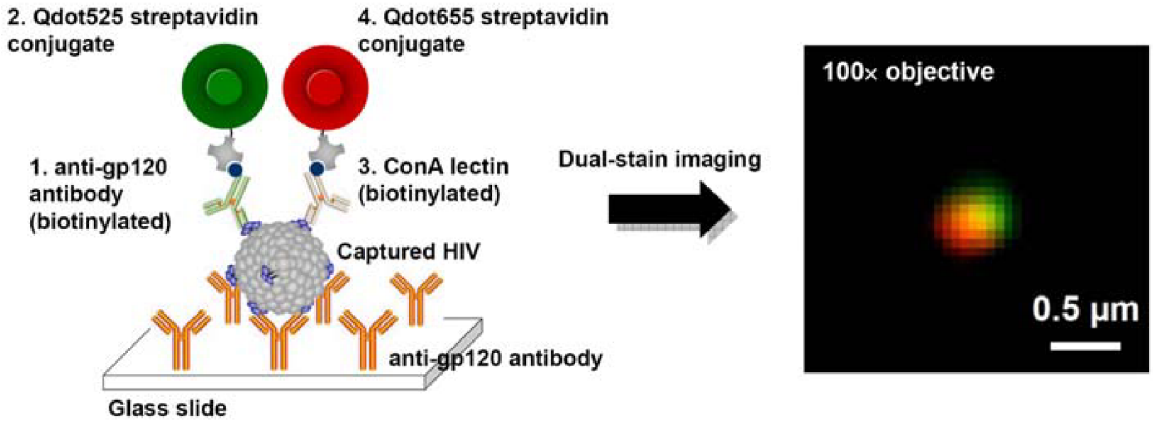

Figura 7. Representação gráfica da captura/imagem do HIV usando a técnica de imagem de dupla coloração e imagens fluorescentes com aumento 100x a partir das partículas de HIV usando a técnica de imagem de dupla coloração, Qdot525/anticorpo (Kim et al., 2009).

A Figura 7 demonstra como o dispositivo microfluídico captura o HIV, através de uma substância chamada gp120-FITC em diferentes quantidades. O dispositivo consegue capturar as proteínas-alvo e reconhecê-las, mesmo em baixas concentrações, > 20 ng/µl. Através deste dispositivo microfluídico, capturou-se o vírus a partir de sangue infetado e elaborou-se imagens usando *quantum dots* e proteínas específicas do HIV.

As partículas de HIV capturadas foram reconhecidas por *quantum dots* e anticorpos específicos. Para confirmar os vírus capturados, utilizou-se uma solução de ConA lectina e, em seguida, uma substância chamada Qdot655 estreptavidina no dispositivo. Os sinais amarelos que se observam nas imagens mostram onde o HIV está. Isso é importante para a criação de um dispositivo de ponto de identificação do HIV conseguindo ver usando um microscópio com uma lente de 10x.

3.3. Nanopartículas orgânicas

As nanopartículas orgânicas (NPOs) representam uma oportunidade para um tratamento eficaz, dado serem um material biocompatível, biodegradável e não tóxico (Mitragotri & Stayton, 2014). As seguintes nanopartículas orgânicas estão a ser investigadas como eficazes no tratamento de infeções virais.

3.3.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas têm sido estudadas como um sistema de veiculação eficaz para a encapsulação de fármacos e são atualmente consideradas como um veículo de terapêuticas insolúveis, por diversas vias de administração (Kurd et al., 2019). Várias nanopartículas poliméricas têm sido estudadas e exploradas para a terapêutica do HIV, bem como de outras diferentes infeções virais.

As nanopartículas poliméricas possuem uma excelente estabilidade química e mecânica, o que significa que podem suportar várias condições ambientais e manter a sua integridade estrutural. Isto é importante para garantir a eficácia e a longevidade do sistema de veiculação de fármacos (Macchione et al., 2020). As nanopartículas poliméricas têm uma capacidade de encapsular o fármaco mais elevada e o potencial de serem direcionadas aos reservatórios de HIV por meio da alteração das suas características a superfície (Ogunwuyi et al., 2016).

Nanopartículas poliméricas são preferencialmente absorvidas pelas células M presentes nas placas de Peyer, localizadas no GALT (tecido linfoide associado ao intestino). Apesar de as células M terem a capacidade de translocar nanopartículas sintéticas, essa absorção ocorre em níveis muito reduzidos. Dessa forma, existe uma oportunidade para aplicar o conceito de direcionamento específico (ativo) das nanopartículas com fármacos antirretrovirais (ARV) para as células M, visando aprimorar a eficácia dos ARVs administrados por via oral (Akala et al., 2014).

Nanopartículas poliméricas foram carregadas com quatro medicamentos antirretrovirais (ARVs) diferentes: zidovudina (nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa), lamivudina (nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa), nevirapina (inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa) e raltegravir (inibidor da transferência de cadeia da integrase do HIV). A eficiência de encapsulação e libertação dos ARVs foi

testada, bem como o efeito das nanopartículas carregadas com ARVs em células T e macrófagos durante a infeção por HIV-1 (Ogunwuyi et al., 2016).

Dois tipos de nanopartículas peguiladas foram sintetizados usando a técnica de polimerização por dispersão: nanopartículas à base de metil metacrilatos e nanopartículas à base de ϵ-caprolactona.

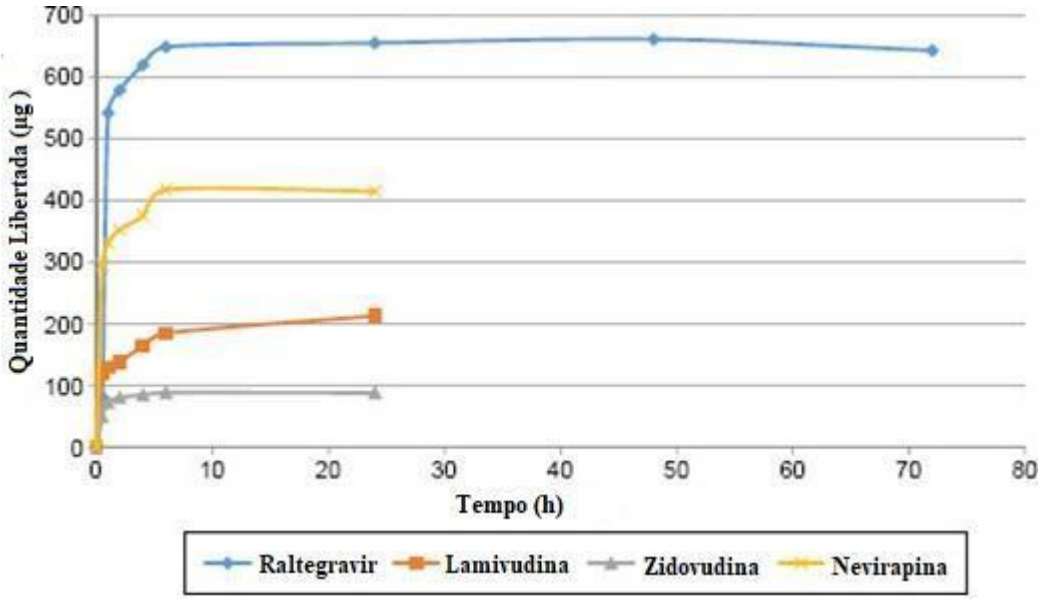

Figura 8. Quantidade acumulada libertada vs tempo para nanopartículas à base de polimetilmetacrilato-PEG carregadas com medicamentos antirretrovirais (Raltegravir: ϵ = 8,15–31,28 µg; Nevirapina: ϵ = 7,5–36,84 µg; Lamivudina: ϵ = 1,20–3,59 µg; e Zidovudina: ϵ = 2).

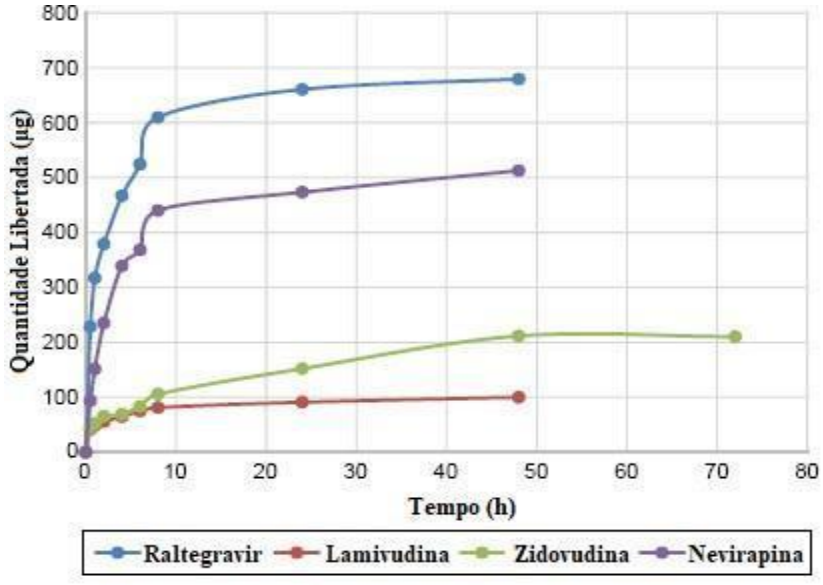

Figura 9. Quantidade acumulada libertada vs tempo para nanopartículas à base de policaprolactona-PEG carregadas com fármacos antirretrovirais (Raltegravir: ϵ = 6,31–30,2 µg; Nevirapina: ϵ = 6,7–57 µg; Lamivudina: ϵ = 0,14–4,71 µg; e Zidovudina: ϵ = 0,56–37,46 µg).

Parece que as propriedades físico-químicas dos fármacos, como a solubilidade, controlam a carga e a libertação a partir das NP. Por exemplo, o raltegravir utilizado neste trabalho (MM: 443,42 g/mol) apresenta baixa solubilidade em água (ou seja, ≥1 mg/mL); é muito pouco solúvel, enquanto o sal de potássio do raltegravir é significativamente mais solúvel em água. Conforme mostrado nas Figuras 8 e 9, as nanopartículas carregadas com raltegravir, com a maior carga, libertaram também a maior quantidade de fármaco, seguidas por nevirapina (MM: 266,31 g/mol), lamivudina (MM: 229,26 g/mol) e zidovudina (MM: 267,4 g/mol). Com base nos dados do Programa de Pesquisa e Reagentes para a SIDA do NIH (Informações sobre Reagentes, setembro de 2011), a ordem de classificação de suas solubilidades aquosas é a seguinte: nevirapina (0,1 mg/mL: solúvel em água) > zidovudina (20 mg/mL: pouco solúvel) > lamivudina (70 mg/mL: solúvel). Assim, os medicamentos ARV mais hidrofóbicos têm uma maior afinidade pelos núcleos hidrofóbicos das nanopartículas, e apresentam alta capacidade de carga das NP e de libertação do fármaco.

3.3.1.1. Ácido poli(lático-co-glicólico)

O ácido poli(lático-co-glicólico), também conhecido como PLGA é um polímero biodegradável que é utilizado em muitos dispositivos aprovados pela FDA, e também como matriz de nanopartículas destinadas à veiculação de fármacos, incluindo os antirretrovirais (Mohideen et al., 2017).

O HIV utiliza o cérebro como um reservatório da infeção, portanto, este órgão é um alvo importante para combater esta patologia (Hong & Banks, 2015). Como a maior parte dos fármacos (por exemplo, efavirenz) não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, as nanopartículas baseadas em PLGA são exploradas dado o seu tamanho reduzido como veículos do fármaco até ao cérebro (Saravanan et al., 2021).

O PLGA é um polímero que, embora muito utilizado em sistemas de veiculação de fármacos, apresenta algumas limitações. Uma desvantagem é a sua taxa de degradação relativamente lenta, que pode afetar a cinética de libertação de fármacos e prolongar a sua presença no organismo. As nanopartículas de PLGA podem ter uma estabilidade limitada, especialmente em ambientes aquosos, o que pode afetar a sua eficiência na veiculação de fármacos (Singh et al., 2016).

A eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLGA pode variar consoante os parâmetros físico-químicos do fármaco e da formulação, o que pode afetar a eficácia terapêutica. Nanopartículas de PLGA podem induzir uma resposta imunitária em alguns casos, levando a inflamação ou dano tecidual (Mobarakeh et al., 2019b).

A lamivudina pertencente à classe de inibidores da transcriptase reversa. O vírus reside nos macrófagos e não podem ser completamente eliminados através da terapêutica convencional. A biodisponibilidade cerebral da lamivudina varia de 0,05% a 1,14%, enquanto a CI50 virológica da lamivudina no cérebro está entre 0,78% e 4,90% (Patel et al., 2018).

As nanopartículas poliméricas manosiladas (NPs) possibilitam o aumento da biodisponibilidade cerebral e a redução da dosagem devido à veiculação eficiente do fármaco no local alvo (Kirimlioğlu et al., 2019). As NPs conseguem atravessar a BHC e entrar na corrente sanguínea cerebral pelo efeito de retenção (Nair et al., 2016). Os recetores de manose encontram-se presentes na superfície dos macrófagos, logo as NPs manosiladas, que contêm fármacos antirretrovirais, têm como alvo os macrófagos, o que melhora o resultado terapêutico e reduz a toxicidade dos fármacos antirretrovirais (Ekinci et al., 2022).

Patel et al., (2018) concluíram que as nanopartículas de Mn-PLGA carregadas com lamivudina podem representar um sistema terapêutico promissor para a veiculação eficiente do fármaco nos macrófagos cerebrais, apresentando, assim, potencial como agente imunoterapêutico no tratamento do HIV-1.

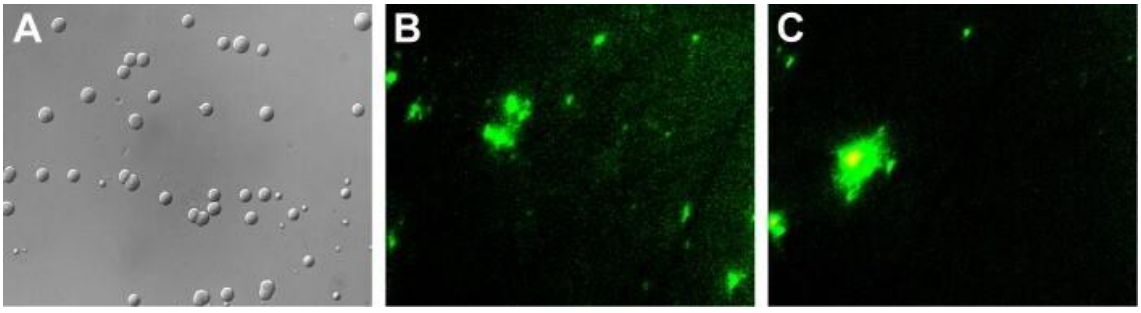

Figura 10. (A) Macrófagos em branco; (B) Nanopartículas de Mn-PLGA marcadas com FITC; (C) Nanopartículas de PLGA marcadas com FITC. Ampliação 500×de Patel et al,. (2018)

A Figura 10 indica que ocorreu uma intensidade de fluorescência mais alta das nanopartículas de Mn-PLGA (vetorização ativa) em comparação com as nanopartículas de PLGA (vetorização passiva) nos macrófagos, sugerindo que as nanopartículas de Mn-PLGA têm maior suscetibilidade para a captação pelos macrófagos em comparação com as nanopartículas de PLGA, devido à interação específica entre as moléculas de manose e o recetor de manose.

Num estudo *in vitro* sistemático, efetuado por Latronico et al., 2021 foram projetadas, preparadas e caracterizadas nanopartículas de PLGA rastreáveis oticamente através de *quantum dots* luminescentes (C-Dots), de forma a avaliar o seu tamanho, forma, estabilidade coloidal e eficiência de encapsulação de darunavir (DRV); finalmente, avaliou-se a sua adequação como nanovetores para a veiculação de DRV para o cérebro (Figura 11). Avaliou-se *in vitro,* principalmente, a sua segurança e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, bem como a eficácia na inibição de MMP-9, que representa um fator patogénico chave no curso da SIDA no sistema nervoso (Nair et al., 2016).

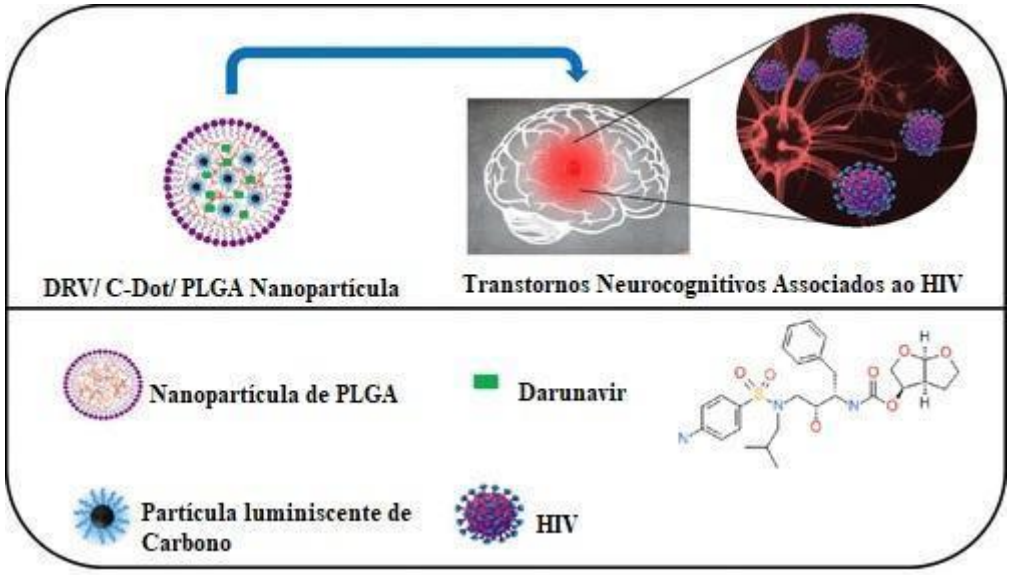

Figura 11. Nanoformulação à base de PLGA carregada com C-Dots e DRV de Latronico et al,. (2022).

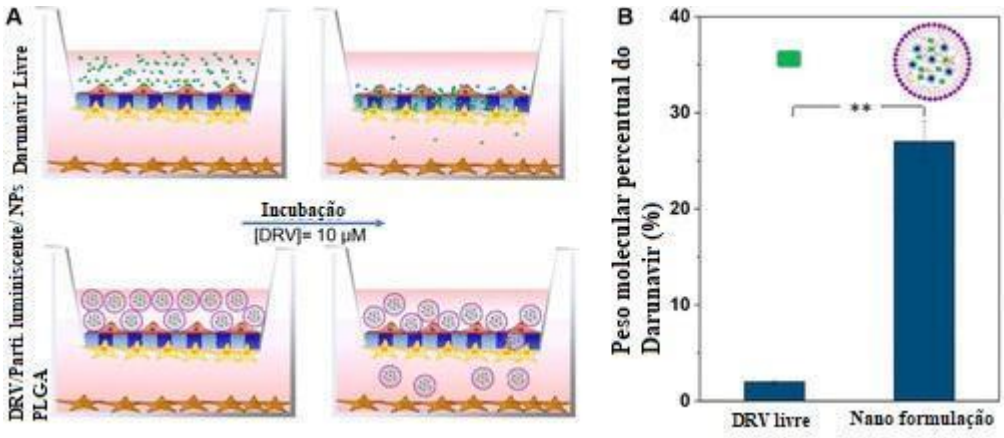

Figura 12. Avaliação da capacidade do DRV de atravessar o modelo in vitro da barreira hematoencefálica. Adaptado de Latronico et al. (2021). Os valores são médios ± desvio padrão (n = 3 replicados; teste t de Student; ** = $p < 0,001$).

Na Figura 12 apresenta-se em esquema de ensaio *in vitro* realizado para investigar a difusão do darunavir, sozinho ou incorporado em NPs de PLGA, através da barreira hematoencefálica artificial (A) e os resultados obtidos num histograma (B) representando as quantidades de darunavir, sozinho e incorporado nas NPs (DRV/C-Dots/PLGA NPs), que permearam o modelo de BHC, calculadas em percentagem do teor do fármaco na câmara inferior em relação à quantidade inicial na câmara superior.

A atividade inibitória retida do DRV incorporado em nanopartículas à base de PLGA em relação à MMP-9 destaca o grande potencial desses nanossistemas para o tratamento não apenas das disfunções neurocognitivas associadas ao HIV, mas também de outros distúrbios neurológicos que poderiam beneficiar clinicamente da inibição das MMPs, com melhor eficácia terapêutica e toxicidade reduzida.

Embora esses resultados tenham sido alcançados usando um modelo *in vitro*, eles representam um pré-requisito necessário antes da validação num modelo *in vivo*.

3.3.1.2. Alginato

Os sais de sódio e potássio do ácido algínico são amplamente utilizados na área biomédica e farmacêutica devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e capacidade de ser facilmente eliminado. No entanto, o tamanho considerável e o elevado peso molecular do ácido algínico reduzem a sua solubilidade em água e, por consequência, afetam o transporte eficiente de fármacos. Para superar essas limitações, o ácido algínico

é modificado quimicamente para ser aplicado em sistemas de veiculação de fármacos. A presença em grande quantidade de grupos hidroxilo no alginato possibilita a ligação deste composto a fármacos e proteínas. Esta união não só aumenta a solubilidade das substâncias, mas também prolonga o tempo em que permanecem na corrente sanguínea e estabiliza os agentes terapêuticos que foram ligados ou encapsulados.

Os sais do ácido algínico são dos polímeros mais utlizados e considerados em aplicações na veiculação de medicamentos (Saravanan et al., 2021). As vantagens que justificam que os alginatos sejam amplamente utilizados na veiculação de fármacos são a sua biocompatibilidade, não-toxicidade e rápida eliminação do corpo.

Foi realizado um estudo em que se encapsularam nanopartículas de alginato (AZT-GAAD NPs) com zidovudina através do método de evaporação de solvente em emulsão. A novidade deste estudo foi a ausência de agentes de reticulação química para a preparação das nanopartículas. Os resultados sugeriram que as nanopartículas de alginato são um vetor capaz de veiculação eficaz de fármacos antivirais na terapêutica do HIV/SIDA (Figura 13).

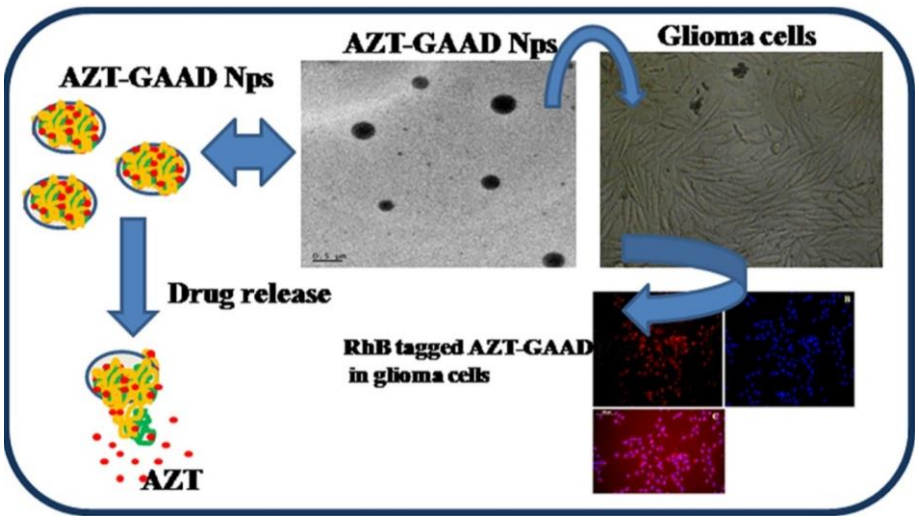

Figura 13. Encapsulação de zidovudina em nanopartículas conjugadas de alginato revestidos PF-68 para veiculação de fármacos anti-HIV de Joshy et al. (2018).

3.3.1.3. Quitosano

O quitosano é um polímero biológico derivado da quitina, um polímero natural presente nas conchas de crustáceos e no exosqueleto dos insetos. As nanopartículas de quitosano possuem propriedades únicas, tais como área de superfície elevada, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Mobarakeh et al., 2019).

Adicionalmente, o quitosano é um polímero conhecido pelas suas propriedades mucoadesivas e reduzida imunogenicidade, que são vantagens de significado relevante em muitos campos de estudo (Mobarakeh et al., 2019).

Um péptido inibidor do HIV-1 derivado do vírus GB-C foi carregado em nanopartículas poliméricas revestidas com glicol-quitosano (Ariza-Sáenz et al., 2017). Estas nanopartículas localizaram-se na mucosa epitelial da camada superior dos macrófagos e libertadas no local onde ocorre a transmissão do HIV sem efeitos secundários. Os resultados sugeriram que os péptidos inibidores de fusão carregados nas nanopartículas revestidas com glicol-quitosano podem representar uma nova abordagem no combate ao HIV-1, uma vez que esta formulação pode alcançar a mucosa epitelial humana e, consequentemente, libertar o péptido S.

Iranpur Mobarakeh et al. (2019) formularam nanopartículas carregadas com siRNA anti-HIV utilizando diferentes proporções de quitosano, polietilenimina e dextrano carboximetilado. Estas nanopartículas reduziram de forma encorajadora a expressão de RNA e a expressão da proteína do HIV-1 em células estáveis e podem potencialmente ser utilizadas em terapêutica génica contra a infeção por HIV.

O saquinavir, inibidor da protease, carregado em nanopartículas de quitosano apresentou maior potencial de encapsulação, e a eficiência no direcionamento celular resultou no controlo da proliferação viral das células T-alvo. As nanopartículas demonstraram em serem eficazes contra duas estirpes de HIV, NL4- 3 e Indie- C1, em concentrações muito baixas quando comparadas com outros nanofármacos sem quitosano (Ramana et al., 2014).

3.6. Nanomicelas e nanopartículas híbridas

As nanomicelas são nanoestruturas coloidais formadas por agregados de moléculas tensioativas ou anfifílicas em solução aquosa (Figura 14). Estas nanoestruturas consistem em numa parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica, que se organizam

espontaneamente de modo a minimizar a energia livre do sistema. A parte hidrofílica fica na parte externa da micela e interage com a água, enquanto a parte hidrofóbica se interioriza, evitando o contato com a água. Deste modo formam-se nanoestruturas esféricas ou globulares com tamanho nanométrico, que podem servir como veículos eficazes para a solubilização e veiculação de substâncias lipofílicas em meios aquosos.

De facto, as nanomicelas são partículas eficazes no combate ao vírus devido às suas propriedades únicas. Como referido, estas partículas são eficazes pois podem encapsular o vírus, o que significa que podem capturar o vírus no seu interior e prevenir que este infete outras células. Outra propriedade importante das nanomicelas é a sua estabilidade coloidal, o que significa que podem permanecer estáveis numa suspensão líquida por muito tempo sem se depositarem ou aglomerarem (Talelli et al., 2015). As nanomicelas têm um tempo de circulação prolongado, o que significa que podem permanecer na corrente sanguínea por mais tempo e ter melhores hipóteses de encontrar e combater o vírus.

As nanopartículas híbridas são o resultado da combinação de duas ou mais variedades distintas de nanopartículas que atuam em conjunto para combater vírus. Estas partículas combinadas são eficazes contra uma variedade de vírus, tais como o HIV, vírus da gripe, vírus da hepatite, adenovírus e ébola (Talelli et al., 2015).

Tabela 2. Nanotransportadores e TARV associada

	Alvo	Terapêutica	Nanossistemas	Ref.
Reservatórios celulares	Leucócitos	Anti-CCR5 siRNA	Lipossoma	(Endsley & Ho, 2012)
	Células T CD4+	LRA (briostatina-2) + ARV (nelfinavir)	Nanopartículas lipídicas	(Puligujja et al., 2013)
	Células T memória em repouso	LRA (vorinostat) + ARV (nelfinavir)	Nanopartículas PEG-PLGA	(Li et al., 2016)
	Macrófagos	ARV (atazanavir)	NanoART (nanoformulações de ARV revestidas por polímero)	(Gu et al., 2017) (Puligujja et al., 2015)
	Astrócitos	siRNA	Nanopartículas de quitosano	(Düzgüneş & Konopka, 2019)
Reservatórios anatómicos	Nódulos Linfáticos	Iopinavir, ritonavir, tenofovir	Nanopartículas lipídicas	(Freeling et al., 2015)
	SNC	Efavirenz Saquinavir Nevirapina Atazanavir e ritonavir	Nanoemulsão Nanosuspensões modificadas em superfície Sistema de transporte por macrófagos para ART cristalino nanoformulado	(Gerson et al., 2014)

ARV: fármacos antirretrovirais; SNC: sistema nervoso central; LRA: agentes de inversão latentes; IN: intranasal; IV: intravenoso; PEG-PLGA: poli(etileno glicol) metil eter-poli(co-glicol); PEO-PPO: poli(óxido etileno)-poli(óxido propileno); SC: subcutâneo

4. Conclusões e perspetivas futuras

A terapêutica antiretroviral convencional apresenta inúmeras limitações, nomeadamente baixa eficácia dos fármacos antirretrovirais e efeitos secundários nas células não alvo, o que resulta em toxicidade e limita a dose a administrar aos doentes.

Os nanoveículos, aparentam ser uma abordagem promissora no tratamento da infeção pelo HIV, aumentado à eficácia dos medicamentos através de combinações sinérgicas ou direcionando-os a locais específicos e de difícil acesso aos fármacos convencionais, que servem como reservatórios do vírus. A nanoveiculação permite resolver algumas das limitações dos fármacos convencionais como incapacidade de atravessar barreiras fisiológicas ou insolubilidade em água, promovendo a libertação prolongada do fármaco, a administração de uma dose mais baixa em comparação com os as terapêuticas convencionais, com menos efeitos secundários e melhor biodisponibilidade. Apesar das inúmeras vantagens a nanotecnologia apresenta obstáculos na transição dos ensaios laboratoriais para os ensaios clínicos.

A abordagem interdisciplinar desempenha um papel crucial no desenvolvimento e avaliação de nanotransportadores para o tratamento do HIV. Colaboração entre diversas áreas, incluindo química, biologia, farmacologia e medicina, são fundamentais para otimizar à eficácia da nanotecnologia. Modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são ferramentas essenciais nesse processo, proporcionando uma compreensão abrangente da interação entre os nanotransportadores e as células, bem como a eficácia e segurança.

Apesar do entusiasmo em torno das promissoras propriedades que a nanotecnologia apresenta, há desafios substanciais na transição dessas inovações do laboratório para ensaios clínicos no contexto do HIV. A complexidade da resposta imunológica, a variabilidade individual na resposta aos tratamentos e a necessidade de avaliação de segurança a longo prazo são alguns dos obstáculos que devem ser cuidadosamente abordados.

Além disso, a nanotecnologia no tratamento da infeção por HIV enfrenta o desafio de atingir efetivamente os reservatórios virais em pacientes, o que pode ser influenciado por fatores como a distribuição heterogénea desses reservatórios e as barreiras biológicas que limitam a sua veiculação. A compreensão desses obstáculos é crucial para o

desenvolvimento de estratégias eficazes que possam ser traduzidas com sucesso para o contexto clínico.

Assim, é imperativo continuar a aprimorar as colaborações interdisciplinares, explorar modelos mais representativos da infeção e desenvolver abordagens inovadoras para superar os desafios específicos relacionados à nanotecnologia no contexto do HIV, a fim de viabilizar sua transição eficaz para ensaios clínicos e, eventualmente, contribuir para a redução da transmissão e cura da infeção pelo HIV.

5. Bibliografia

WHO Pulse Survey/WHO HHS Department COVID-19 Survey 2. UNAIDS/WHO/UNICEF HIV Service Tracking Database 3. WHO HHS Department Assessment of HIV Testing Services and ART Services Disruptions in the context of COVID-19 4. WHO Global Clinical Platform for COVID-19. (n.d.).

Ariza-Sáenz, M., Espina, M., Bolaños, N., Calpena, A. C., Gomara, M. J., Haro, I., & García, M. L. (2017). Penetration of polymeric nanoparticles loaded with an HIV-1 inhibitor peptide derived from GB virus C in a vaginal mucosa model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *120*, 98–106. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.08.008

Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(4). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A007161

Bale, S., Goebrecht, G., Stano, A., Wilson, R., Ota, T., Tran, K., Ingale, J., Zwick, M. B., & Wyatt, R. T. (2017). Covalent Linkage of HIV-1 Trimers to Synthetic Liposomes Elicits Improved B Cell and Antibody Responses. *Journal of Virology*, *91*(16). https://doi.org/10.1128/JVI.00443-17

Bol'Shakov, O. I., & Akala, E. O. (2014). MS-Monitored Conjugation of Poly(ethylene glycol) Monomethacrylate to RGD Peptides. *Journal of Applied Polymer Science. Applied Polymer Symposium*, *131*(14). https://doi.org/10.1002/APP.40385

Bruner, K. M., Hosmane, N. N., & Siliciano, R. F. (2015). Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends in Microbiology*, *23*(4), 192. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.01.013

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, *9*(2). https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS9020012

Cao, S., & Woodrow, K. A. (2019). Nanotechnology approaches to eradicating HIV reservoirs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *138*, 48–63. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2018.06.002

Chandra, P. K., Rutkai, I., Kim, H., Braun, S. E., Abdel-Mageed, A. B., Mondal, D., & Busija, D. W. (2021). Latent HIV-Exosomes Induce Mitochondrial Hyperfusion Due to Loss of

Phosphorylated Dynamin-Related Protein 1 in Brain Endothelium. *Molecular Neurobiology*, *58*(6), 2974–2989. https://doi.org/10.1007/S12035-021-02319-8

Chen, J., Zhou, T., Zhang, Y., Luo, S., Chen, H., Chen, D., Li, C., & Li, W. (2022). The reservoir of latent HIV. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 945956. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.945956/BIBTEX

Chen, Z., Moon, J. J., & Cheng, W. (2018). Quantitation and Stability of Protein Conjugation on Liposomes for Controlled Density of Surface Epitopes. *Bioconjugate Chemistry*, *29*(4), 1251–1260. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.8B00033/SUPPL_FILE/BC8B00033_SI_001.PDF

De Souza E Silva, J. M., Hanchuk, T. D. M., Santos, M. I., Kobarg, J., Bajgelman, M. C., & Cardoso, M. B. (2016). Viral Inhibition Mechanism Mediated by Surface-Modified Silica Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(26), 16564–16572. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B03342

Di Gianvincenzo, P., Marradi, M., Martínez-Ávila, O. M., Bedoya, L. M., Alcamí, J., & Penadés, S. (2010). Gold nanoparticles capped with sulfate-ended ligands as anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *20*(9), 2718–2721. https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2010.03.079

Dong, X., Moyer, M. M., Yang, F., Sun, Y. P., & Yang, L. (2017). Carbon Dots' Antiviral Functions Against Noroviruses. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00675-x

Düzgüneş, N., & Konopka, K. (2019). Eradication of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected Cells. *Pharmaceutics 2019, Vol. 11, Page 255*, *11*(6), 255. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11060255

EACS European AIDS Clinical Society 1 EACS Guidelines 12.0. (2018).

Ekinci, M., Öztürk, A. A., Santos-Oliveira, R., & İlem-Özdemir, D. (2022). The use of Lamivudine-loaded PLGA nanoparticles in the diagnosis of lung cancer: Preparation, characterization, radiolabeling with 99mTc and cell binding. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *69*, 103139. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103139

Endsley, A. N., & Ho, R. J. Y. (2012). Design and characterization of novel peptide-coated lipid nanoparticles for targeting anti-HIV drug to CD4 expressing cells. *The AAPS Journal*, *14*(2), 225–235. https://doi.org/10.1208/S12248-012-9329-6

Faria, M. J., Lopes, C. M., Das Neves, J., & Lúcio, M. (2021). Lipid Nanocarriers for Anti-HIV Therapeutics: A Focus on Physicochemical Properties and Biotechnological Advances. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 1294*, *13*(8), 1294. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081294

Faria, M. J., Machado, R., Ribeiro, A., Gonçalves, H., Real Oliveira, M. E. C. D., Viseu, T., Neves, J. Das, & Lúcio, M. (2019). Rational Development of Liposomal Hydrogels: A Strategy for Topical Vaginal Antiretroviral Drug Delivery in the Context of HIV Prevention. *Pharmaceutics*, *11*(9). https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11090485

Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgrefe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., Beilman, G. J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T. E., Anderson, J., Perkey, K., Stevenson, M., Perelson, A. S., Douek, D. C., Haase, A. T., & Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 2307–2312. https://doi.org/10.1073/PNAS.1318249111

Freeling, J. P., Koehn, J., Shu, C., Sun, J., & Ho, R. J. Y. (2015). Anti-HIV drug-combination nanoparticles enhance plasma drug exposure duration as well as triple-drug combination levels in cells within lymph nodes and blood in primates. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *31*(1), 107–114. https://doi.org/10.1089/AID.2014.0210

Gerson, T., Makarov, E., Senanayake, T. H., Gorantla, S., Poluektova, L. Y., & Vinogradov, S. V. (2014). Nano-NRTIs demonstrate low neurotoxicity and high antiviral activity against HIV infection in the brain. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *10*(1), 177–185. https://doi.org/10.1016/J.NANO.2013.06.012

Global HIV Programme. (n.d.). Retrieved November 7, 2023, from https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics

Gu, J., Al-Bayati, K., & Ho, E. A. (2017). Development of antibody-modified chitosan nanoparticles for the targeted delivery of siRNA across the blood-brain barrier as a

strategy for inhibiting HIV replication in astrocytes. *Drug Delivery and Translational Research*, *7*(4), 497–506. https://doi.org/10.1007/S13346-017-0368-5

Honeycutt, J. B., Thayer, W. O., Baker, C. E., Ribeiro, R. M., Lada, S. M., Cao, Y., Cleary, R. A., Hudgens, M. G., Richman, D. D., & Victor Garcia, J. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nature Medicine*, *23*(5), 638–643. https://doi.org/10.1038/NM.4319

Hong, S., & Banks, W. A. (2015). Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain, Behavior, and Immunity*, *45*, 1–12. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2014.10.008

Iranpur Mobarakeh, V., Modarressi, M. H., Rahimi, P., Bolhassani, A., Arefian, E., Atyabi, F., & Vahabpour, R. (2019a). Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 305–315. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.036

Iranpur Mobarakeh, V., Modarressi, M. H., Rahimi, P., Bolhassani, A., Arefian, E., Atyabi, F., & Vahabpour, R. (2019b). Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 305–315. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.036

Iranpur Mobarakeh, V., Modarressi, M. H., Rahimi, P., Bolhassani, A., Arefian, E., Atyabi, F., & Vahabpour, R. (2019c). Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 305–315. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.036

Joshy, K. S., Susan, M. A., Snigdha, S., Nandakumar, K., Laly, A. P., & Sabu, T. (2018a). Encapsulation of zidovudine in PF-68 coated alginate conjugate nanoparticles for anti-HIV drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*(PartA), 929–937. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.078

Joshy, K. S., Susan, M. A., Snigdha, S., Nandakumar, K., Laly, A. P., & Sabu, T. (2018b). Encapsulation of zidovudine in PF-68 coated alginate conjugate nanoparticles for anti-HIV drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*(PartA), 929–937. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.078

Kemnic, T. R., & Gulick, P. G. (2022). HIV Antiretroviral Therapy. *StatPearls*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513308/

Kerry, R. G., Malik, S., Redda, Y. T., Sahoo, S., Patra, J. K., & Majhi, S. (2019). Nano-based approach to combat emerging viral (NIPAH virus) infection. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *18*, 196–220. https://doi.org/10.1016/J.NANO.2019.03.004

Kim, Y.-G., Moon, S., Kuritzkes, D. R., & Demirci, U. (2009). *Quantum dot-based HIV detection and imaging in a microfluidic chip*.

Kurd, M., Malvajerd, S. S., Rezaee, S., Hamidi, M., & Derakhshandeh, K. (2019a). Oral delivery of indinavir using mPEG-PCL nanoparticles: preparation, optimization, cellular uptake, transport and pharmacokinetic evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *47*(1), 2123–2133. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1616553

Kurd, M., Malvajerd, S. S., Rezaee, S., Hamidi, M., & Derakhshandeh, K. (2019b). Oral delivery of indinavir using mPEG-PCL nanoparticles: preparation, optimization, cellular uptake, transport and pharmacokinetic evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *47*(1), 2123–2133. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1616553

Laird, G. M., Bullen, C. K., Rosenbloom, D. I. S., Martin, A. R., Hill, A. L., Durand, C. M., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2015). Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 1901–1912. https://doi.org/10.1172/JCI80142

Latronico, T., Rizzi, F., Panniello, A., Laquintana, V., Arduino, I., Denora, N., Fanizza, E., Milella, S., Mastroianni, C. M., Striccoli, M., Curri, M. L., Liuzzi, G. M., & Depalo, N. (2021). Luminescent PLGA Nanoparticles for Delivery of Darunavir to the Brain and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9, a Relevant Therapeutic Target of HIV-Associated Neurological Disorders. *ACS Chemical Neuroscience*, *12*(22), 4286–4301. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00436/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CN1C00436_M003.GIF

Li, W., Yu, F., Wang, Q., Qi, Q., Su, S., Xie, L., Lu, L., & Jiang, S. (2016). Co-delivery of HIV-1 entry inhibitor and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor shuttled by nanoparticles: cocktail therapeutic strategy for antiviral therapy. *AIDS (London, England)*, *30*(6), 827–837. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000971

Macchione, M. A., Bedoya, D. A., Figueroa, F. N., Muñoz-Fernández, M. Á., & Strumia, M. C. (2020). Nanosystems Applied to HIV Infection: Prevention and Treatments.

International Journal of Molecular Sciences, *21*(22), 1–29. https://doi.org/10.3390/IJMS21228647

Microbiologia Médica de António Meliço-Silvestre, Helena Barroso e Nuno Taveira - Livro - WOOK. (n.d.). Retrieved November 12, 2023, from https://www.wook.pt/livro/microbiologia-medica-helena-barroso/15653281

Milovanovic, M., Arsenijevic, A., Milovanovic, J., Kanjevac, T., & Arsenijevic, N. (2017). Nanoparticles in Antiviral Therapy. *Antimicrobial Nanoarchitectonics*, 383. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52733-0.00014-8

Mitragotri, S., & Stayton, P. (2014). Organic nanoparticles for drug delivery and imaging. *MRS Bulletin*, *39*(3), 219–223. https://doi.org/10.1557/MRS.2014.11/TABLES/1

Mohideen, M., Quijano, E., Song, E., Deng, Y., Panse, G., Zhang, W., Clark, M. R., & Saltzman, W. M. (2017). Degradable bioadhesive nanoparticles for prolonged intravaginal delivery and retention of elvitegravir. *Biomaterials*, *144*, 144–154. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.08.029

Nair, M., Jayant, R. D., Kaushik, A., & Sagar, V. (2016). Getting into the brain: Potential of nanotechnology in the management of NeuroAIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *103*, 202–217. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.02.008

Ogunwuyi, O., Kumari, N., Smith, K. A., Bolshakov, O., Adesina, S., Gugssa, A., Anderson, W. A., Nekhai, S., & Akala, E. O. (2016). Antiretroviral Drugs-Loaded Nanoparticles Fabricated by Dispersion Polymerization with Potential for HIV/AIDS Treatment. *Https://Doi.Org/10.4137/IDRT.S38108*, *9*, IDRT.S38108. https://doi.org/10.4137/IDRT.S38108

Öztürk, A. A., & Yurtdaş Kirimlioğlu, G. (2019). Preparation and in vitro characterization of lamivudine loaded nanoparticles prepared by acid and/or ester terminated PLGA for effective oral anti-retroviral therapy. *JOURNAL OF RESEARCH IN PHARMACY*, *23*(5), 897–913. https://doi.org/10.35333/JRP.2019.37

Patel, B. K., Parikh, R. H., & Patel, N. (2018). Targeted delivery of mannosylated-PLGA nanoparticles of antiretroviral drug to brain. *International Journal of Nanomedicine*, *13*(13), 97–100. https://doi.org/10.2147/IJN.S124692

Pedro, K. D., Henderson, A. J., & Agosto, L. M. (2019). Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. *Virus Research*, *265*, 115–121. https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2019.03.014

Puligujja, P., Araínga, M., Dash, P., Palandri, D., Mosley, R. L., Gorantla, S., Poluektova, L., McMillan, J. E., & Gendelman, H. E. (2015). Pharmacodynamics of folic acid receptor targeted antiretroviral nanotherapy in HIV-1-infected humanized mice. *Antiviral Research*, *120*(1), 85–88. https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2015.05.009

Puligujja, P., McMillan, J. E., Kendrick, L., Li, T., Balkundi, S., Smith, N., Veerubhotla, R. S., Edagwa, B. J., Kabanov, A. V., Bronich, T., Gendelman, H. E., & Liu, X. M. (2013). Macrophage Folate Receptor-Targeted Antiretroviral Therapy Facilitates Drug Entry, Retention, Antiretroviral Activities and Biodistribution for Reduction of Human Immunodeficiency Virus Infections. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*(8), 1263–1273. https://doi.org/10.1016/J.NANO.2013.05.003

Ramana, L. N., Sharma, S., Sethuraman, S., Ranga, U., & Krishnan, U. M. (2014). Evaluation of chitosan nanoformulations as potent anti-HIV therapeutic systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1840*(1), 476–484. https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.10.002

Ruelas, D. S., & Greene, W. C. (2013). An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, *155*(3), 519. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.09.044

Saravanan, M., Mostafavi, E., Vincent, S., Negash, H., Andavar, R., Perumal, V., Chandra, N., Narayanasamy, S., Kalimuthu, K., & Barabadi, H. (2021). Nanotechnology-based approaches for emerging and re-emerging viruses: Special emphasis on COVID-19. *Microbial Pathogenesis*, *156*, 104908. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.104908

Siegfried, N., van der Merwe, L., Brocklehurst, P., & Sint, T. T. (2011). Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. https://doi.org/10.1002/14651858.cd003510.pub3

Singh, D., McMillan, J. E., Hilaire, J., Gautam, N., Palandri, D., Alnouti, Y., Gendelman, H. E., & Edagwa, B. (2016). Development and characterization of a long-acting nanoformulated abacavir prodrug. *Https://Doi.Org/10.2217/Nnm-2016-0164*, *11*(15), 1913–1927. https://doi.org/10.2217/NNM-2016-0164

Solid Lipid Nanoparticles - Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices. (n.d.). Retrieved October 27, 2023, from https://ebrary.net/61023/engineering/solid_lipid_nanoparticles

Talelli, M., Barz, M., Rijcken, C. J. F., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Lammers, T. (2015). Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today*, *10*(1), 93–117. https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2015.01.005

Theys, K., Libin, P., Pineda-Peña, A. C., Nowé, A., Vandamme, A. M., & Abecasis, A. B. (2018). The impact of HIV-1 within-host evolution on transmission dynamics. *Current Opinion in Virology*, *28*, 92–101. https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2017.12.001

Thomas, J., Ruggiero, A., Procopio, F. A., Pantaleo, G., Paxton, W. A., & Pollakis, G. (2019). Comparative analysis and generation of a robust HIV-1 DNA quantification assay. *Journal of Virological Methods*, *263*, 24–31. https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2018.10.010

Tokatlian, T., Kulp, D. W., Mutafyan, A. A., Jones, C. A., Menis, S., Georgeson, E., Kubitz, M., Zhang, M. H., Melo, M. B., Silva, M., Yun, D. S., Schief, W. R., & Irvine, D. J. (2018). Enhancing Humoral Responses Against HIV Envelope Trimers via Nanoparticle Delivery with Stabilized Synthetic Liposomes. *Scientific Reports 2018 8:1*, *8*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34853-2

Van Der Ryst, E. (2015). Maraviroc – A CCR5 Antagonist for the Treatment of HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology*, *6*(JUN). https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00277

What to Start: Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient | NIH. (n.d.). Retrieved November 8, 2023, from https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/what-start-initial-combination-regimens-antiretroviral-naive-1

Zulfiqar, H. F., Javed, A., Sumbal, A., Afroze, B., Ali, Q., Akbar, K., Nadeem, T., Rana, M. A., Nazar, Z. A., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2017a). HIV Diagnosis and Treatment through Advanced Technologies. *Frontiers in Public Health*, *5*. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2017.00032

Zulfiqar, H. F., Javed, A., Sumbal, A., Afroze, B., Ali, Q., Akbar, K., Nadeem, T., Rana, M. A., Nazar, Z. A., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2017b). HIV Diagnosis and Treatment

through Advanced Technologies. *Frontiers in Public Health*, *5*, 1. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2017.00032