



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**VEICULAÇÃO E VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS AO CÉREBRO**

Trabalho submetido por  
**Ana Vitória Fidalgo Polido**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2014**



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**VEICULAÇÃO E VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS AO CÉREBRO**

Trabalho submetido por  
**Ana Vitória Fidalgo Polido**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Ana Isabel Fernandes**

**Outubro de 2014**

*"The dictionary is the only place where success comes before work. Hard work is the price we must pay for success. I think you can accomplish anything if you're willing to pay the price." Vince Lombardi*



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais pelo esforço enorme que fizeram durante estes 5 longos anos, pela educação que me deram e pelos valores transmitidos. Sem eles nada disto seria possível.

Um agradecimento muito especial à minha Mãe, a minha maior referência, pelo apoio para lá de incondicional e pela sua infundável paciência, por nunca me deixar desistir e por acreditar nas minhas capacidades até mais do que eu própria. “No language can express the power, and beauty, and heroism, and the majesty of a mother’s love.” Edwin Hubbel Chapin

Um grande obrigado aos meus avós maternos, Isidro e Vitória, meus segundos pais, que em muito contribuíram para a minha educação e formação como ser humano e que jamais vou esquecer.

Ao meu tio e padrinho, João Paulo, por ter sempre as palavras certas nos momentos certos, pela preocupação constante, pelas gargalhadas e momentos felizes.

À minha prima Ana Isabel e ao meu amigo Diogo que mesmo estando tão longe estiveram sempre tão perto e tão presentes e sempre acreditaram em mim.

Às minhas amigas, Joana Pessoa, Marina Marques, Joana Caetano, Salomé Marques, Daniela Gonçalves, Patrícia Rodrigues e Inês Castelo, por compreenderem as minhas ausências, pelas palavras de consolo nos momentos difíceis e por terem orgulho em mim e no que estou prestes a alcançar.

Aos meus colegas de turma e de ano, pelas vivências que me proporcionaram, pois sem eles esta etapa não teria sido tão enriquecedora.

A todos os professores que partilharam comigo os seus conhecimentos e que contribuíram para a minha formação profissional e me ensinaram grande parte daquilo que hoje sei.

À minha orientadora, Prof. Doutora Ana Isabel Fernandes, pela disponibilidade, pelas palavras de compreensão e apoio, pela paciência e motivação e por me ajudar a controlar a ansiedade.



## **Resumo**

O cérebro, sendo um dos órgãos mais nobres e delicados do organismo humano encontra-se extremamente protegido da entrada de substâncias potencialmente nocivas ao desempenho das suas funções através da barreira hematoencefálica (BHE) que, por meio de processos físicos e enzimáticos, controla também o aporte cerebral de nutrientes. Contudo, os mesmos mecanismos que têm um importante papel na sua proteção e nutrição limitam também a passagem de fármacos para os tecidos neuronais, constituindo assim um obstáculo no tratamento de determinadas patologias. Assim, o tratamento de doenças mentais e neurológicas como a esclerose múltipla, o Parkinson, o Alzheimer e alguns tumores cerebrais constituem um enorme desafio para a Medicina e a Tecnologia Farmacêutica. A vetorização cerebral de fármacos é uma das estratégias que permite contornar a dificuldade de veicular substâncias ao cérebro e tem como principais objetivos a maximização dos seus efeitos terapêuticos e a diminuição da sua toxicidade através do direcionamento destes ao seu local de ação. De um modo geral, as estratégias de veiculação e vetorização cerebral de fármacos inserem-se em três categorias distintas: manipulação e modificação química de fármacos, alteração transitória da permeabilidade da BHE e recurso a vias de administração alternativas. Dentro de cada uma delas distinguem-se diferentes abordagens que variam entre técnicas não invasivas, como a encapsulação de fármacos em lipossomas e nanopartículas, e técnicas invasivas como a injeção direta de fármacos na circulação cerebral como ocorre na administração intracerebral (IC) e intraventricular (IVT) de fármacos. Não existe, no entanto, nenhum método totalmente eficaz e desprovido de efeitos adversos ou limitações.

Na presente monografia abordam-se as diferentes estratégias de veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro, referindo-se as suas vantagens e desvantagens, com particular destaque para as formulações atualmente disponíveis no mercado.

**Palavras-Chave:** Cérebro; Vetorização cerebral; Barreira hematoencefálica; Nanotecnologia.

## **Abstract**

The brain, one of the noblest and most delicate organs of the human body, is extremely protected from entry of substances, which can be potentially harmful to the performance of its functions, through the blood-brain barrier (BBB) that, through physical and enzymatic processes, also controls the supply of nutrients to the brain. However, the same mechanisms that play an important role in nutrition and protection also limit the passage of drugs to neuronal tissues, thus representing an obstacle in the treatment of certain pathologies. Therefore, treatment of mental and neurological diseases such as multiple sclerosis, Parkinson's, Alzheimer's and some brain tumours are a huge challenge for Medicine and Pharmaceutical Technology. Brain targeting of drugs is one of the strategies that allows to circumvent the difficulty of conveying substances to the brain and its main goals are to maximize its therapeutic effects and decreased toxicity, by directing drugs to their site of action. In general, strategies for brain delivery and targeting of drugs fall into three distinct categories: manipulation and chemical modification of drugs, transient modification of the permeability of the BBB and the use of alternative routes of administration. Within each category different approaches can be found, ranging from non-invasive techniques, such as encapsulation of drugs into liposomes and nanoparticles, and invasive techniques such as direct injection of drugs into the cerebral circulation, as in the intracerebral (IC) and intraventricular (IVT) administration of drugs. However, no method is completely effective and devoid of adverse effects or limitations.

This monograph addresses the different strategies to deliver and target drugs to the brain, referring to their advantages and disadvantages, with particular emphasis on the formulations currently available on the market.

**Key-Words:** Brain; Brain targeting; Blood-Brain-Barrier; Nanotechnology.

## Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Índice.....	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	13
2. Estrutura e função da barreira hematoencefálica.....	17
3. Fatores que afetam a permeabilidade de fármacos através da barreira hematoencefálica.....	23
4. Estratégias de veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro.....	25
4.1 Manipulação e modificação química de fármacos.....	25
4.1.1 Pró-fármacos e análogos lipofílicos.....	26
4.1.2 Transportadores coloidais de partículas e encapsulação de fármacos.....	29
4.1.2.1 Lipossomas e micelas.....	29
4.1.2.2 Nanopartículas.....	36
4.2 Transporte mediado por transportadores e recetores endógenos.....	39
4.2.1 Recetor da transferrina.....	41
4.2.2 Recetor da insulina.....	42
4.2.3 Recetores das lipoproteínas de baixa densidade LRP-1 e LRP-2...43	
4.2.4 Recetor da toxina da difteria.....	44

4.2.1 Inibição de transportadores de efluxo.....	46
4.3 Veiculação de fármacos com recurso a células.....	48
4.4 Disrupção da barreira hematoencefálica.....	50
4.4.1 Disrupção farmacológica.....	51
4.4.2 Disrupção osmótica.....	53
4.4.3 Disrupção química.....	57
4.4.4 Disrupção física.....	60
4.5 Vias de administração alternativas.....	64
4.5.1 Via intranasal.....	64
4.5.2 Administração intratecal.....	67
4.5.3 Administração intraventricular e intracerebral.....	68
4.5.4 Dispositivos de implantação cerebral.....	69
4.5.4.1 Reservatório Ommaya.....	70
4.5.5 Administração fármacos através do ouvido interno.....	72
5. Conclusões e perspetivas futuras.....	73
6. Referências bibliográficas.....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Barreiras existentes entre o sangue e o cérebro.....	18
<b>Figura 2</b> - Diferenças de morfológicas entre os capilares cerebrais e os capilares periféricos.....	20
<b>Figura 3</b> – Estratégias de veiculação de pró-fármacos.....	28
<b>Figura 4</b> – Incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos em lipossomas e micelas.....	30
<b>Figura 5</b> – Multifuncionalidade de lipossomas e nanopartículas.....	32
<b>Figura 6</b> – A: Representação esquemática do reservatório Ommaya; B: Reservatório Ommaya implantado e administração de fármaco.....	71

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> – Níveis de vetorização de fármacos.....	15
<b>Tabela II</b> – Características ideais de um sistema de vetorização de fármacos.....	16
<b>Tabela III</b> – Transportadores de influxo e efluxo expressos na barreira hematoencefálica.....	21
<b>Tabela IV</b> – Exemplos de formulações lipossômicas utilizadas no tratamento e diagnóstico de doenças do sistema nervoso central.....	35
<b>Tabela V</b> – Fármacos veiculados com recurso a nanopartículas e principais polímeros utilizados.....	38
<b>Tabela VI</b> – Substratos, inibidores e indutores da glicoproteína P.....	46
<b>Tabela VII</b> – Fármacos e substâncias que provocam a disrupção da barreira hematoencefálica.....	52
<b>Tabela VIII</b> - Procedimento de disrupção osmótica da barreira hematoencefálica.....	55
<b>Tabela IX</b> – Moduladores das <i>tight junctions</i> e outras substâncias que alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica.....	59
<b>Tabela X</b> – Mecanismos celulares dos ultrassons.....	62
<b>Tabela XI</b> – Vantagens e desvantagens da administração intranasal de fármacos.....	67

## Lista de Abreviaturas

**ADEPT** - *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*

**BHE** – Barreira hematoencefálica

**EBC** – *European Brain Council*

**EUA** - Estados Unidos da América

**GDEPT** – *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*

**gpP** – Glicoproteína P

**IC** - Intracerebral

**IN** – Intranasal

**IT** – Intratecal

**IVT** - Intraventricular

**LAT** – *Large neutral amino acid transporter*

**LDL** – *Low-density lipoproteins*

**LRP** – *Low-density lipoprotein related protein*

**MM** – Massa molecular

**NO** – Óxido nítrico

**OCV** – Órgãos circunventriculares

**PEG** – Polietilenoglicol

**PEI** - Polietilenoimina

**PLGA** – Copolímero de ácido láctico e glicólico

**RI** – Recetor da insulina

**RT** – Recetor da transferrina

**RTD** – Recetor da toxina da difteria

**SFM** – Sistema fagocítico mononuclear

**SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SNC** – Sistema nervoso central

**TJ** – *Tight junctions*



## 1. Introdução

Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que as doenças neurológicas e mentais constituem um terço das doenças diagnosticadas nos países desenvolvidos (Olesen e Leonardi, 2003). A maior parte destas patologias é crónica e progressiva e não possui cura. Alguns dos tratamentos atualmente disponíveis por vezes não são suficientes para aliviar os seus sintomas ou deixam de ser eficazes em determinado estadió da doença levando assim a uma diminuição da qualidade de vida dos doentes, ao absentismo laboral e à necessidade de cuidadores de saúde e acompanhamento especial dos mesmos. Em termos económicos, segundo um estudo efetuado em 30 países da Europa e publicado no *European Journal of Neurology*, estima-se que o custo total das doenças neurológicas e mentais a nível Europeu tenha atingido os 798 biliões de euros no ano de 2010 tendo-se verificado um aumento significativo em relação a 2004, ano em que este valor ascendeu apenas aos 386 biliões de euros (Olesen, Gustavsson, Svensson, Wittchen e Jönsson, 2012). De um modo geral, as doenças neuromusculares e os tumores cerebrais encontram-se no topo da tabela no que concerne ao custo do seu tratamento. Em Portugal, o custo das doenças neurológicas e mentais *per capita* foi estimado em 1234€, um valor ligeiramente inferior ao valor médio registado na Europa, 1550€ (Olesen et al., 2012). De acordo com o *European Brain Council* (EBC) desde o início de Janeiro até final de Setembro de 2014 os custos económicos das doenças neurológicas e cerebrais já tinham atingido os €585,273,745,218 (disponível em <http://www.europeanbraincouncil.org/>).

Face a estes dados, torna-se premente investir no desenvolvimento de novos tratamentos e novas estratégias de veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro, tendo o EBC considerado o presente ano de 2014 o Ano Europeu do Cérebro. Esta iniciativa pretende essencialmente sensibilizar, educar e desafiar mentalidades no sentido de modificar as perceções atuais e, acima de tudo, proteger este órgão vital para o organismo humano. Dado que se assiste ao envelhecimento da população e a um aumento de doenças que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), impulsionar e promover a investigação na área da Neurologia e o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos constitui também uma meta a atingir. A título de exemplo, encontram-se entre alguns dos grandes laboratórios farmacêuticos que suportam e apoiam esta iniciativa a Abbott, AstraZeneca, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, GlaxoSmithKline, Merck Serono, Pfizer e Roche (Baker, 2013).

A vetorização de fármacos é uma das estratégias mais promissoras para o desenvolvimento de novas formulações e consiste em direcionar e aumentar a biodisponibilidade de moléculas com atividade terapêutica nos seus locais de ação, dotando-as de uma maior seletividade e eficácia, minimizando-se assim os seus efeitos adversos. Esta abordagem revela-se particularmente útil para fármacos pouco seletivos e/ou muito tóxicos como os antineoplásicos, ou para atingir órgãos de difícil acesso como o cérebro. Delinear novas estratégias de vetorização e desenvolver fármacos que atinjam a circulação cerebral é particularmente desafiante na medida em que aproximadamente 100% das moléculas de grandes dimensões não conseguem atingir o SNC e cerca de 98% dos fármacos de pequenas dimensões não atravessam a BHE (Pardridge, 2003). Um estudo que analisou sensivelmente 7000 fármacos revelou que apenas 5% conseguiu efetivamente alcançar o cérebro, sendo que a sua massa molecular (MM) média rondava os 357 Da (Ghose, Viswanadhan e Wendoloski, 1999). Estes dados demonstram indubitavelmente as dificuldades encontradas na veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro.

O direcionamento ou vetorização de fármacos pode efetuar-se de forma passiva ou ativa. Quando, após administração, o fármaco se acumula no organismo de forma espontânea de acordo com a sua distribuição natural ou segundo a distribuição intrínseca do seu vetor estamos perante uma vetorização passiva (Torchilin, 2000). Esta estratégia é particularmente vantajosa quando se pretende atingir órgãos ou células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), antigamente também designado sistema reticulo endotelial, como o baço, o fígado ou os gânglios linfáticos, os lisossomas ou as células mononucleares da medula óssea (Hume, 2006). Esta vantagem é motivada pelo facto de os sistemas de vetorização de fármacos serem complexos de grandes dimensões e serem reconhecidos pelo sistema imunitário como corpos estranhos ao organismo. Assim, estas partículas ao serem detetadas na corrente sanguínea são opsonizadas pelas células do SFM e deste modo conduzidas ao seu local de ação (Owens e Peppas, 2006).

Por outro lado, a vetorização ativa caracteriza-se pela conjugação do fármaco ou vetor onde este está encapsulado a um resíduo de vetorização, diretamente ou através de um ligando, com afinidade para recetores, enzimas ou outras moléculas endógenas específicas, expressas no local que se pretende atingir (Gujral e Khatri, 2013). Na vetorização cerebral recorre-se com frequência a anticorpos monoclonais direcionados a recetores e transportadores expressos na BHE, como resíduos de vetorização.

Independentemente das suas características, o resíduo de vetorização possui nomeadamente três funções distintas: favorecer e direcionar a distribuição do fármaco no organismo, proteger o fármaco da ação enzimática e em consequência evitar o seu metabolismo e perda de atividade, e ainda impedir a sua *clearance*. Em resumo, a vetorização ativa compreende um maior leque de estratégias e aplicações terapêuticas e confere ao sistema de veiculação de fármacos uma maior probabilidade de sucesso.

Conforme referido anteriormente, o resíduo de vetorização pode ser ligado covalentemente ao fármaco ou adsorvido à superfície de transportadores do tipo coloidal (sistemas de partículas) como os lipossomas, nanopartículas e micelas ou a moléculas de elevada MM e solubilidade em água (transportadores macromoleculares solúveis) como o polietilenoglicol (PEG) (Tucker, Yang e Mujoo, 2012; Masserini, 2013). Novos transportadores de fármacos incluem eritrócitos, monócitos, bacteriófagos e vírus, no entanto mais estudos são necessário para aprofundar o seu uso na prática clínica e, acima de tudo, a sua segurança (Solomon, 2008; Shah, 2011).

De acordo com o destino do vetor podem definir-se três níveis de vetorização, tal como apresentado na Tabela I.

**Tabela I** – Níveis de vetorização de fármacos (Gujral e Khatri, 2013).

Nível de vetorização	Destino do fármaco	Exemplo
<b>Primeira ordem</b>	Distribuição num determinado órgão	Fígado, Cérebro
<b>Segunda ordem</b>	Distribuição numa parte específica de um órgão	Células de Kupffer, Células tumorais
<b>Terceira ordem</b>	Distribuição intracelular	Interação com proteínas citoplasmáticas

Particularizando para o tema abordado nesta monografia, se se considerar a veiculação de fármacos ao cérebro como a sua passagem através da BHE apenas, a vetorização é classificada como vetorização de 1ª ordem. No entanto, quando o objetivo é veicular fármacos a uma região específica do cérebro, como no caso de tumores cerebrais, estamos perante uma vetorização de 2ª ordem. Em terapia génica pretende-se que o fármaco alcance o núcleo das células pelo que o nível de vetorização atingido é de 3ª ordem.

Segundo investigadores do *Maharaja Surajamal Institute of Pharmacy* em Nova Deli, um sistema ideal de vetorização de fármacos deve possuir as características apresentadas na Tabela II (Gujral e Khatri, 2013).

**Tabela II** – Características ideais de um sistema de vetorização de fármacos.

Ausência de imunogenicidade e toxicidade
Bioquimicamente inerte
Física e quimicamente estável, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
Seletividade
Distribuição uniforme nos capilares e tecidos alvo
Reprodutibilidade
Boa relação custo-efetividade
Transportadores biodegradáveis
Libertação controlada do fármaco

Alguns dos desafios com que as empresas se deparam no desenvolvimento de terapêuticas para doenças neurológicas e mentais são a complexidade do funcionamento cerebral e a escassa informação existente acerca da sua fisiopatologia, desenvolvimento e progressão. O facto de haver necessidade de o fármaco atravessar a BHE, a tendência destes fármacos para causarem efeitos secundários a nível do SNC, o tempo que demoram a chegar ao mercado (12-16 anos) em comparação com outros fármacos (10-12 anos) e os custos envolvidos em todo o processo de desenvolvimento e produção constituem alguns dos obstáculos e dificuldades emergentes em todo o processo até á autorização de introdução no mercado (Alavijeh, Chishty, Qaiser e Palmer, 2005).

De um modo geral distinguem-se essencialmente três abordagens na veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro. As três principais estratégias são a administração direta de fármacos no cérebro, a alteração momentânea da permeabilidade da BHE e a modificação e manipulação química de fármacos (Wang, Siahaan e Soltero, 2005).

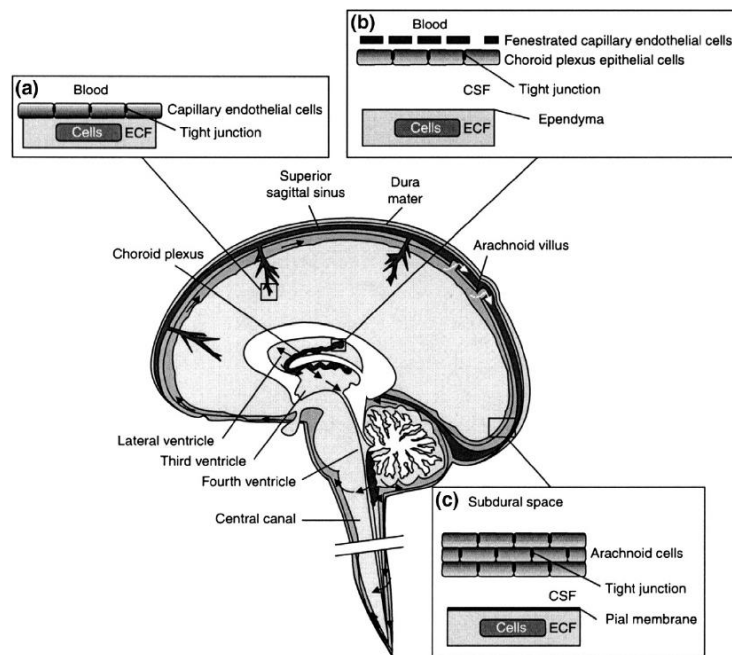
De forma a ilustrar a complexidade cerebral e proporcionar uma melhor compreensão do tema sobre o qual incide a presente monografia serão abordados brevemente as características e funções da BHE e os fatores que afetam a passagem de fármacos através da mesma.

## **2. Estrutura e função da barreira hematoencefálica**

Dadas as características únicas do cérebro, este é um dos órgãos menos acessíveis à entrada de fármacos, pois, sendo um dos órgãos mais nobres e delicados do corpo humano encontra-se extremamente protegido quer por estruturas ósseas, quer por uma membrana física, imunológica, enzimática e de transporte denominada de BHE.

A BHE é uma membrana semipermeável que separa a circulação sanguínea geral da circulação cerebral e que tem a seu cargo as funções de regular a concentração de iões, como o sódio e o potássio, no líquido cefalo-raquidiano (LCR), controlar a neurotransmissão ao auxiliar na manutenção dos níveis de neurotransmissores quer a nível periférico quer a nível central, proteger o cérebro da entrada de xenobióticos, metabolitos tóxicos e microrganismos, e nutrir o SNC (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof e Begley, 2010). Esta membrana desenvolve-se entre o 3º e 9º mês de gestação e está totalmente formada na altura do nascimento, embora ainda imatura. Todos os organismos vivos cujo SNC se encontra bem desenvolvido possuem BHE (Saunders, Knott e Dziegielewska, 2000; Ballabh, Braun e Nedergaard, 2004). Para além da BHE existem ainda duas outras zonas de interface entre o sangue e o cérebro que limitam a permuta de substâncias entre estes dois compartimentos: a barreira sangue- LCR situada ao nível do plexo coroideu, onde é produzido o LCR, e a barreira aracnoide, sendo que a última, por apresentar uma reduzida área de superfície e ausência de vasos sanguíneos, não constitui uma importante via de entrada de moléculas para o SNC (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof e Begley, 2010). Adicionalmente, quando se está perante um caso de tumor intracraniano, existe ainda outro obstáculo a ultrapassar conquanto que os vasos que nutrem as células cancerígenas formam uma estrutura designada de barreira sangue-tumor que impede o acesso de fármacos ao interior do mesmo (Misra, Ganesh, Shahiwala e Shah, 2003).

Foi Paul Ehrlich que em 1885 demonstrou pela primeira vez que existia uma barreira entre o SNC e a circulação verificando que após administração intravenosa de um corante vital todos os órgãos adquiriam coloração exceto o SNC. Anos mais tarde, Edwin Goldmann veio confirmar a sua descoberta ao observar que o mesmo corante ficava retido no SNC após administração deste no líquido cérebro-espinhal (Bellavance, Blanchette e Fortin, 2008).



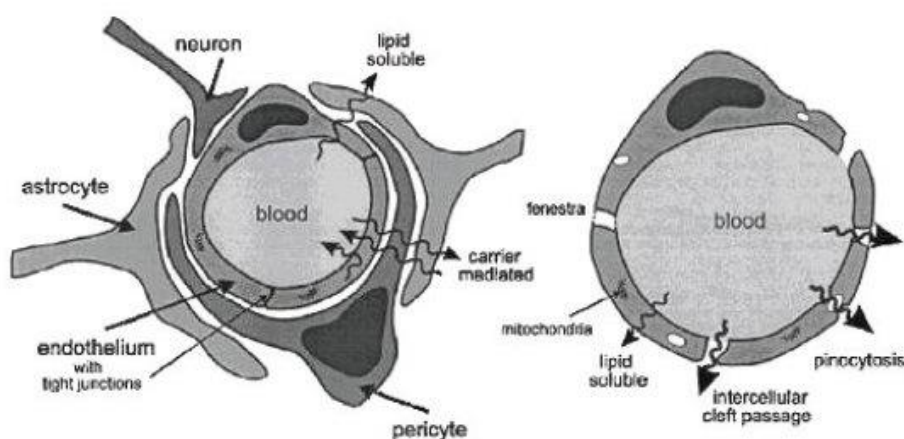
**Figura 1** – Barreiras existentes entre o sangue e o cérebro (Abbott et al., 2010).

A – Barreira Hematoencefálica, B - Barreira Sangue - Líquido cefalo-raquidiano, C - Barreira Aracnoide.

A BHE é uma barreira de difusão que regula de forma altamente seletiva a permuta de substâncias entre o sangue e o SNC e é constituída por uma monocamada contínua e uniforme de células endoteliais que formam as paredes dos capilares que perfundem o cérebro (Abbott, 2004; Cardoso, Brites e Brito, 2010). Estima-se que no cérebro humano existam sensivelmente 100 bilhões de capilares que cobrem cerca de 95% da superfície cerebral correspondente a uma área de aproximadamente 12 a 18 m<sup>2</sup> e possuam um comprimento total de 650 km. Uma vez que os capilares se encontram distanciados apenas 40 µm, virtualmente cada neurónio é nutrido pelo seu próprio capilar e a extensa área de superfície por estes formada faz com que as células endoteliais sejam apontadas como a principal via de entrada de fármacos para os tecidos cerebrais (Pardridge, 2003). O reduzido diâmetro e a fina espessura dos capilares que compõem a BHE diferenciam-nos dos vasos presentes em outros órgãos (Figura 2). Estes capilares possuem ainda uma maior densidade mitocondrial em comparação com outros capilares devido às elevadas necessidades energéticas do cérebro e, conseqüentemente, um citoplasma com menor área (Davson e Segal, 1995). As células endoteliais dos capilares que formam a BHE encontram-se unidas através estruturas denominadas de *tight junctions* (TJ) que limitam

o fluxo paracelular de moléculas para o SNC, sendo as verdadeiras responsáveis pelas propriedades de barreira física atribuídas à BHE. Estas estruturas resultam da interação entre proteínas transmembranares, como as claudinas, ocludinas e as *junctions adherence molecules*, e proteínas citoplasmáticas. As *adherence junctions* fazem também parte integrante das TJ e todo este complexo sistema de proteínas é regulado através de vias de sinalização celular nas quais intervêm sobretudo as proteínas quinases (Matter e Balda, 2003; Krizbai e Deli, 2003; González-Mariscal, Tapia e Chamorro, 2008). Como tal, todos estes componentes das TJ constituem potenciais alvos terapêuticos de fármacos que possuam capacidade de modular e alterar as suas funções e, por conseguinte, provocar uma disrupção na BHE melhorando a sua absorção e aumentando a biodisponibilidade cerebral de moléculas com atividade terapêutica (Deli, 2009). As TJ parecem ainda exercer funções ao nível da regulação da expressão de determinados genes, proliferação e diferenciação celular (Ballabh et al., 2004). Outras características que tornam a BHE numa membrana única são a sua reduzida atividade pinocítica, ausência de capilares fenestrados e de drenagem linfática, carência de sistema de histocompatibilidade e carga superficial negativa (Williams, Alvarez e Lackner, 2001; Streit, Conde, Fendrick, Flanary e Mariani, 2005; Abbott, Rönnbäck e Hansson, 2006; Rip, Schenk e de Boer, 2009). A sua elevada resistência elétrica estimada entre 1000 e 2000 ohm cm<sup>2</sup> origina uma barreira à entrada de substâncias polares e ionizadas no cérebro, imputando-se este seu atributo ao facto de expressar proteínas distintas daquelas que são encontradas nos capilares periféricos, nomeadamente as ocludinas que compõem as TJ (Butt, Jones e Abbott, 1990). A homeostase cerebral depende ainda de elementos celulares e outras estruturas adicionais como os astrócitos, pericitos e células gliais que, concomitantemente com as TJ, formam um conjunto denominado de Unidade Neurovascular. Estes componentes possuem funções de suporte da BHE e revestem-se de particular importância uma vez que regulam a sua atividade e contribuem para o seu normal funcionamento (Krol, 2012).

Para além da função de barreira física propriamente dita, a BHE possui ainda uma intensa atividade metabólica, enzimática e de transporte e por isso fazem parte integrante desta membrana uma grande variedade de enzimas, recetores e transportadores de influxo e efluxo que, respetivamente, facilitam e limitam a entrada de substâncias na circulação cerebral (Tabela III).



**Figura 2** – Diferenças morfológicas entre os capilares cerebrais e os capilares periféricos (Misra et al., 2003).

Contudo, a BHE não é uma membrana homogênea a nível molecular uma vez que existem algumas regiões do SNC que não expressam a BHE clássica possuindo capilares semelhantes aqueles encontrados na periferia. Estas regiões situam-se em redor dos ventrículos cerebrais e são denominadas de órgãos circunventriculares (OCV). A neurohipófise, o plexo coroideu, a glândula pineal e a área postrema são exemplos de OCV e uma vez que são áreas mais permeáveis a substâncias exógenas constituem uma possível via de veiculação de fármacos ao cérebro (Madrid, Langer, Brem e Langer, 1991).

Sabe-se ainda que as características da BHE se modificam em situações patológicas como na epilepsia (Abbott, Rönnbäck e Hansson, 2006; Zlokovic, 2008), esclerose múltipla (Correale e Villa, 2007), em condições de hipoxia e isquemia (Kaur e Ling, 2008), na doença de Parkinson e na doença de Alzheimer (Desai, Monahan, Carvey e Hendey, 2007), em caso de neoplasias (Bronger et al., 2005), em situações de glaucoma (Ballantine, Bell e Manlapaz, 1960) e nas doenças lisossomais (Begley, Pontikis e Scarpa, 2008). O consumo de álcool e o coma hipoglicémico podem também alterar as propriedades desta membrana (Yorulmaz, Seker e Oztas, 2011).

**Tabela III** – Transportadores de influxo e efluxo expressos na barreira hematoencefálica ( Wang, Siahaan e Soltero, 2005; Jouyban e Soltani, 2010; Kumar, Gupta e Sharma, 2012).

<b>Nome do Transportador</b>	<b>Substratos</b>	<b>Fármacos e Nutrientes</b>	<b>Influxo/Efluxo</b>
<b>LAT - 1</b>	Aminoácidos neutros, L-tirosina, L-fenilalanina	Melfalano, gabapentina, levodopa, baclofeno	Influxo/Efluxo
<b>Transportador de ácidos monocarboxílicos</b>	Inibidores da HMG-CoA com grupo carboxílico, ácido láctico, ácido acético	Sinvastatina, lovastatina, ácido salicílico	Influxo
<b>Transportador de nucleósidos</b>	Purinas e pirimidinas	Adenosina, gencitabina, zidovudina, zalcitabina	Influxo
<b>Transportador de íons</b>	Transporte bidirecional de íons	Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Influxo/Efluxo
<b>GLUT - 1</b>	Hexoses, ácido ascórbico	Glucose, morfina glicosilada	Influxo
<b>gpP</b>	Xenobióticos, metabolitos tóxicos	Antineoplásicos, glucocorticóides	Efluxo

Alterações que podem ocorrer na BHE compreendem a formação de poros nas membranas celulares das células endoteliais induzidos por fármacos antipsicóticos e antidepressivos, aumento da atividade pinocítica em resposta a um aumento da pressão arterial, e aumento do transporte paracelular de substâncias e extravasamento de proteínas plasmáticas como consequência da ruptura das TJ devido à produção de mediadores químicos envolvidos na inflamação (bradicininas, serotonina, histamina, radicais livres, trombina, substância P) (Witt e Davis, 2006). Aminoácidos como a taurina, glutamato e aspartato; Óxido nítrico (NO), Adenosina trifosfato (ATP), Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina- $\beta$  (IL- $\beta$ ) produzidos pelos astrócitos parecem também estar envolvidos na disfunção da BHE (Annunziata, Cioni, Toneatto e Paccagnini, 1998; Abbott, 2000; Pan, Kastin, Gera e Stewart, 2001). Podem ocorrer ainda alterações na expressão de determinados transportadores ao nível das células endoteliais e das células da glia e um aumento da adesão e migração de leucócitos essencialmente em patologias de base inflamatória e autoimune (Potschka, 2010; Kovács, Heinemann e Steinhäuser, 2012). Todas estas alterações resultam num aumento da permeabilidade da BHE e melhor penetração de fármacos e outras moléculas na circulação cerebral.

Salienta-se também que existem regiões do SNC mais suscetíveis de sofrerem estas alterações do que outras como o hipocampo e o córtex cerebral, embora a explicação para este fenómeno permaneça desconhecida (Abbott e Friedman, 2012).

Em resumo, o acesso restrito e altamente controlado de substâncias aos tecidos cerebrais deve-se essencialmente a 5 fatores: presença de TJ que limitam o transporte paracelular de substâncias, reduzida atividade pinocítica da BHE e, conseqüentemente, transporte transcelular diminuto, ausência de capilares fenestrados que bloqueiam a passagem intercelular de substâncias, função de barreira enzimática da BHE que cinge a entrada de determinadas moléculas, vírus e proteínas no cérebro e presença de transportadores de efluxo na BHE como a glicoproteína-P (gpP) e outros sistemas.

### **3. Fatores que afetam a permeabilidade de fármacos através da barreira hematoencefálica**

Muitas vezes a ineficácia terapêutica de algumas moléculas não está relacionada com ausência de potência mas sim com a ineficácia do método pelo qual são veiculadas ou com a sua estrutura e características físico-químicas. Os fatores que limitam a penetração de fármacos no cérebro são a sua massa molecular, o coeficiente de partição, a constante de ionização a pH fisiológico e o número de ligações de hidrogênio que a molécula pode estabelecer (Pajouhesh e Lenz, 2005). Assim, fármacos lipofílicos cujo coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) se situe entre 0,5 e 6,0, com massa molecular entre os 400-600 Da, ou inferior, e não ionizados a pH fisiológico têm maior probabilidade de atingir o SNC em concentrações terapêuticas (Juillerat-Jeanneret, 2008). Contudo, uma vez que fármacos com elevada lipofilia apresentam um elevado volume de distribuição, extensa ligação às proteínas plasmáticas e, conseqüentemente, um menor tempo de semivida devido ao seu rápido metabolismo hepático, o  $\log P$  considerado ótimo e que permite manter um equilíbrio entre a quantidade de fármaco que é absorvido e aquela que é alvo do efeito de primeira passagem está compreendido entre 1,5 e 2,5 (Madrid, Langer, Brem e Langer, 1991).

Sabe-se ainda que compostos com tendência para formar mais do que 6 ligações de hidrogênio e com uma área de superfície polar superior a  $80 \text{ \AA}^2$  possuem uma passagem diminuta para os tecidos neuronais (Clark, 2003). Se, por um lado, a presença de ligações flexíveis e estruturas ramificadas restringe a passagem de fármacos para o cérebro, a afinidade para transportadores presentes na BHE é um fator que influencia positivamente a sua permeabilidade (Kemper, Boogerd, Thuis, Beijnen e Van Tellingen, 2004). Moléculas com carga positiva a pH fisiológico, como é o caso das bases, conseguem penetrar mais facilmente do que moléculas com carga negativa devido à interação electrostática com proteínas presentes na membrana apical das células endoteliais que compõem a BHE que, conforme discutido anteriormente, apresentam carga superficial negativa (Abbott et al., 2010). Infelizmente poucos, ou mesmo nenhum fármaco engloba as características consideradas ideais acima enunciadas, e mesmo aqueles que cumprem algumas delas veem a sua passagem através da BHE limitada devido à presença de transportadores de efluxo extremamente eficazes (Lipinski, 2000).



#### **4. Estratégias de veiculação e vetorização de fármacos ao cérebro**

De um modo geral, as estratégias de veiculação e vetorização cerebral de fármacos inserem-se em três categorias distintas: manipulação e modificação química de fármacos, alteração transitória da permeabilidade da BHE e recurso a vias de administração alternativas. Dentro de cada uma delas distinguem-se diferentes abordagens mais propensas a veicular determinados tipos de fármacos ou a ser aplicadas na prática clínica em determinadas patologias, ou com indicação em situações específicas, não existindo, no entanto, nenhum método totalmente eficaz e desprovido de efeitos adversos ou limitações.

Seguidamente, serão descritas as características e discutidas as vantagens e desvantagens de cada uma das estratégias.

##### **4.1 Manipulação e modificação química de fármacos**

Uma vez conhecidas as características que uma molécula deve apresentar para alcançar concentrações cerebrais terapêuticas constata-se que, tal como anteriormente referido, praticamente nenhum fármaco consegue reuni-las na íntegra. De modo a favorecer e melhorar a sua penetração cerebral surge a possibilidade de modificar e manipular quimicamente moléculas dotadas de atividade terapêutica através, respetivamente, da sua encapsulação em transportadores coloidais de partículas e do *design* de pró-fármacos e análogos lipofílicos. Devido à sua ampla aplicação, quer em doenças neurológicas e mentais, quer em patologias com diferente etiologia, a fármacos biológicos e a moléculas produzidas por síntese química, e a possibilidade de veiculação e vetorização de fármacos a órgãos específicos (incluindo o cérebro), perspectiva-se um futuro promissor para esta abordagem.

#### 4.1.1 Pró-fármacos e análogos lipofílicos

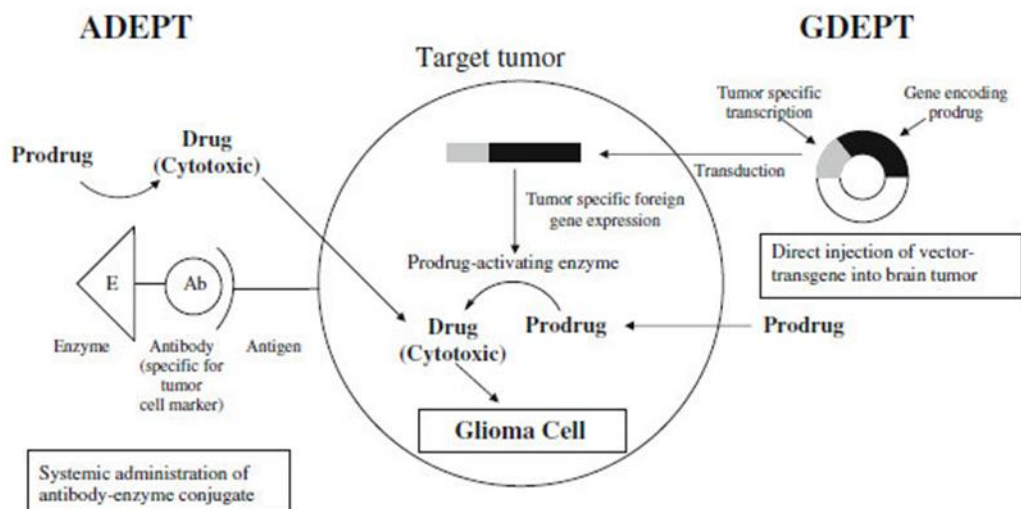
O conceito de pró-fármaco surgiu em 1958 e foi uma das primeiras estratégias idealizadas para contornar a dificuldade de veicular fármacos ao cérebro. Um pró-fármaco é um precursor químico derivado de uma substância com atividade terapêutica que não possui atividade farmacológica mas que após reação enzimática ou hidrólise cede o princípio ativo que exerce o efeito terapêutico (Rautio et al., 2008). O *design* de pró-fármacos representa uma ferramenta útil para melhorar a penetração cerebral de fármacos pois mascarando os seus grupos polares, quer através da introdução de moléculas lipídicas como ácidos gordos, fosfolípidos ou glicéridos, quer através da sua esterificação, confere-se uma maior lipofilia aos compostos, característica fundamental de que uma molécula deve ser dotada de modo a atravessar facilmente membranas e barreiras biológicas como a BHE. Este processo designado, em inglês, de *lipidization* permite assim alcançar concentrações cerebrais de fármaco mais elevadas (Pardridge, 2007). Por sua vez, um análogo lipofílico é uma substância que possui um maior coeficiente de partição que o fármaco que lhe deu origem devido à sua natureza lipofílica e que teoricamente é mais facilmente absorvida através das membranas biológicas. Ao contrário de um pró-fármaco, um análogo lipofílico tem atividade terapêutica mas, regra geral, devido às modificações estruturais de que é alvo e devido ao facto de ter uma ligação às proteínas plasmáticas mais extensa possui uma atividade terapêutica inferior à molécula de base. Assim, embora os casos de sucesso sejam relativamente reduzidos, a lipidização de pró-fármacos é mais viável e conduz a maiores probabilidades de sucesso (Rautio, Laine, Gynther e Savolainen, 2008). O exemplo clássico de um pró-fármaco que após lipidização penetra mais facilmente no cérebro é a heroína, um pró-fármaco da morfina. Por ser uma molécula mais lipofílica, a heroína atravessa a BHE a uma velocidade 100 vezes superior à morfina. Uma vez nos tecidos neuronais os grupos acetilo da heroína sofrem hidrólise originando a morfina que fica retida nestes devido à sua natureza hidrofílica (Oldendorf, Hyman, Braun e Oldendorf, 1972).

Para que o uso de pró-fármacos seja uma estratégia eficaz é importante que estes cumpram alguns critérios de vetorização. Em primeiro lugar, o pró-fármaco deve conseguir atingir o tecido alvo rapidamente e a sua conversão em fármaco deve ser seletiva, ou seja, deve ser efetuada próximo do órgão alvo. Por sua vez, o fármaco deve ter capacidade de ficar retido no tecido a tratar de forma a exercer o seu efeito terapêutico

(Anderson, 1996). É também fundamental garantir que, após clivagem e conversão do pró-fármaco em fármaco, a molécula remanescente não apresenta toxicidade e é fácil e rapidamente eliminada pelo organismo. Muitas vezes é possível prever, a partir das características do fármaco, se um pró-fármaco possui os elementos básicos para obter sucesso. Segundo Rautio et al (2008), se um fármaco apresenta uma entrada e saída do SNC idênticas é espectável que um pró-fármaco favoreça a sua penetração no cérebro e que após conversão, o fármaco por ser uma molécula mais hidrofílica fique retido no local desejado.

O *design* de pró-fármacos conduz inevitavelmente a um aumento da MM da molécula final e o aumento da sua lipofilia traduz-se numa ampla ligação as proteínas plasmáticas afetando a sua difusão através das membranas. Ao longo do seu transporte até ao cérebro o pró-fármaco pode sofrer degradação enzimática e hidrólise na corrente sanguínea pelo que a sua veiculação em sistemas de partículas como os lipossomas e nanopartículas permite preservar a sua integridade e estabilidade (Dhanikula e Panchagnula, 2005; Carafa et al., 2010). Assim, uma vez que a absorção de pró-fármacos através de difusão passiva está comprometida, pode recorrer-se ao seu transporte através de transportadores endógenos ou através de duas técnicas denominadas de *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT) e *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (GDEPT). Ou seja, o pró-fármaco pode ser respetivamente, conjugado com uma enzima acoplada a um anticorpo monoclonal específico de um determinado recetor expresso à superfície da BHE, ou pode ser veiculado a partir de um transgene injetado diretamente no parênquima cerebral (Figura 3).

Uma das maiores limitações desta abordagem está relacionada com o facto de após conversão do pró-fármaco em fármaco este continuar a ser vulnerável à ação dos transportadores de efluxo. Para contornar este problema pode recorrer-se à coadministração do pró-fármaco e de um inibidor dos transportadores de efluxo (Breedveld, Beijnen e Schellens, 2006) ou mascarar os grupos funcionais do pró-fármaco reconhecidos por estes transportadores.



**Figura 3** – Estratégias de veiculação de pró-fármacos (Rautio et al., 2008).

A conjugação de um pró-fármaco com um inibidor dos transportadores de efluxo constitui também uma possível estratégia a explorar. Duas moléculas anti-parkinsonianas, a L-dopa ou levodopa (pró-fármaco da dopamina) e o entacapone (inibidor da COMT – Catecol-O-Metiltransferase) foram conjugadas com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade da L-dopa no SNC sugerindo que este método poderia ser aplicado na veiculação de outras substâncias ao cérebro (Leppänen et al, 2002). Não obstante, a inibição crónica de transportadores de efluxo pode culminar numa acumulação de substâncias tóxicas para o SNC pelo que, aquando do seu uso, devem ser avaliados os prós e contras e, sobretudo, a segurança desta abordagem. O único pró-fármaco aprovado e utilizado atualmente na prática clínica é a L-Dopa que utiliza como sistema de transporte o transportador LAT-1 (*large neutral amino acid transporter*) presente na BHE pelo que, também por ser considerado o tratamento *gold standard* na doença de Parkinson, não pode deixar de ser mencionado neste capítulo (Hornykiewicz, 2010). Uma técnica inovadora que requer múltiplos passos sequenciais para a conversão do pró-fármaco em fármaco é denominada de *Chemical Drug Delivery* em inglês, ou veiculação química de fármacos. Baseando-se na previsibilidade das reações químicas que a molécula irá sofrer até atingir o seu órgão alvo, esta técnica distingue-se da abordagem clássica de pró-fármaco pois requer mais do que um passo para que o pró-fármaco exiba atividade farmacológica. Um artigo publicado em 2008 por investigadores finlandeses, cuja leitura é recomendada, oferece uma visão geral e integrada da vasta aplicação da veiculação de pró-fármacos ao SNC (Rautio et al., 2008).

#### **4.1.2 Transportadores coloidais de partículas e encapsulação de fármacos**

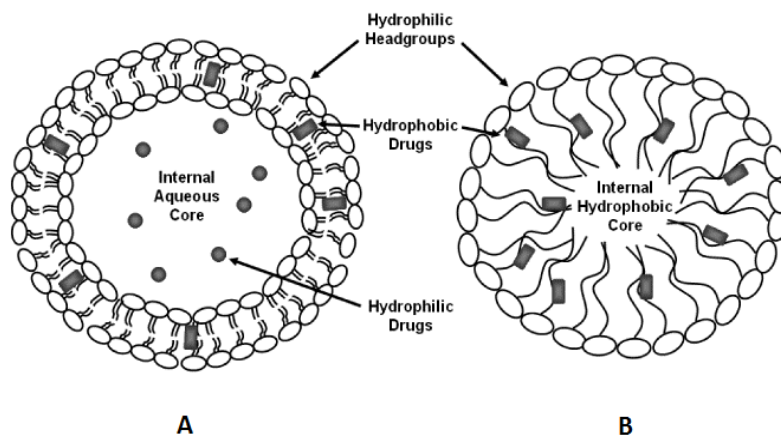
O desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica nas últimas décadas e a sua abrangente aplicação veio possibilitar a veiculação de fármacos através de transportadores coloidais de partículas como os lipossomas, micelas e nanopartículas. A encapsulação de moléculas com atividade terapêutica nestes sistemas permite não só aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade ao conferir-lhes proteção contra reações enzimáticas mas também mascarar as suas características físico-químicas que limitam o seu tempo de semivida e transporte cerebral.

O sucesso destes sistemas na veiculação de fármacos ao cérebro depende da capacidade de transpor e aplicar todos os conhecimentos teóricos adquiridos até ao momento sobre o cérebro e sobre estes sistemas de partículas no seu desenvolvimento, mas também da sua correta formulação e administração.

De seguida serão abordados os principais sistemas coloidais de partículas utilizados em formulações farmacêuticas, os lipossomas e as nanopartículas, destacando-se aquelas que já se encontram disponíveis no mercado em Portugal.

##### **4.1.2.1 Lipossomas e micelas**

Os lipossomas, considerados as nanopartículas de primeira geração e por vezes designados de nanopartículas lipídicas, foram produzidos pela primeira vez em 1961 no Reino Unido por um hematologista britânico chamado Alec Bangham (Deamer, 2010). Constituídos por uma, ou mais, bicamadas de fosfolípidos com características anfipáticas, são vesículas que permitem a incorporação de fármacos e outras moléculas com propriedades físico-químicas distintas. Moléculas hidrofílicas tendem a ser veiculadas no interior da cavidade formada pelos fosfolípidos que as compõem, enquanto moléculas hidrofóbicas são incluídas na zona apolar da camada fosfolipídica, como representado na Figura 4. Por sua vez, as micelas são sistemas esféricos constituídos apenas por uma camada de fosfolípidos que se dispõem, quando em contacto com meio aquosos, com as suas extremidades polares voltadas para o exterior formando uma cavidade hidrofóbica (Figura 4).



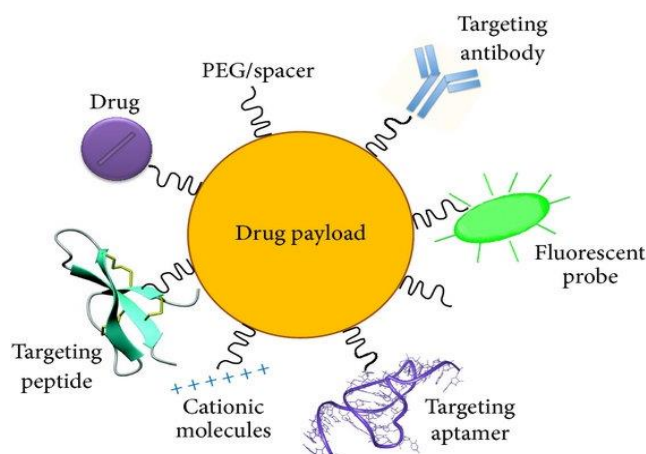
**Figura 4** – Incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos em lipossomas e micelas (Khan, 2010).  
**A** – Representação de um Lipossoma; **B** – Representação de uma Micela.

Dado que um sistema ideal de transporte de fármacos deve ser biocompatível e biodegradável, de forma prevenir a sua acumulação nos órgãos e tecidos e consequente toxicidade, estas partículas são geralmente formuladas com lípidos presentes nas membranas biológicas como a esfingomiéline, a fosfatidilcolina e glicerofosfolípidos. O colesterol é frequentemente adicionado a estas vesículas pois, para além de diminuir a sua permeabilidade e o extravasamento de fármaco, parece aumentar a estabilidade dos lipossomas e micelas *in vivo* (Batista, Moraes, Carvalho e Santos, 2007).

Os lipossomas e as micelas ditos convencionais são apenas constituídos por fosfolípidos e colesterol, e apresentam como principal desvantagem uma elevada *clearance* decorrente da sua opsonização e fagocitose por células do SFM (Sapra e Allen, 2003), o que pode ser vantajoso quando se pretende atingir órgãos como o fígado e o baço (vetorização passiva), por exemplo. A estabilidade destas partículas pode ainda ser afetada por processos químicos e físicos na medida em que são suscetíveis à hidrólise e oxidação devido à sua natureza lipídica e pode haver formação de agregados ou fusão das vesículas. De forma a promover a sua integridade e ultrapassar estes problemas recorre-se à sua liofilização e à adição de antioxidantes e moléculas lipídicas carregadas positivamente como o diacetilfosfato, que criam uma repulsão electroestática entre as partículas

evitando a sua agregação (Batista et al., 2007). A simples alteração de parâmetros como o tamanho, carga e composição permite diminuir a captação destas partículas pelo SFM. Investigadores holandeses demonstraram que lipossomas com 400 nm são removidos da corrente sanguínea mais rapidamente e por conseguinte possuem um tempo de semivida menor do que lipossomas com dimensões inferiores (Laverman e Boerman, 1999). A par com as nanopartículas, projeta-se nos lipossomas um futuro promissor. Todavia, no que respeita à sua toxicidade, os lipossomas, ao invés destas, são de um modo geral menos tóxicos uma vez que são compostos por lípidos naturalmente presentes no organismo, possuindo assim características mais favoráveis à sua implementação em termos clínicos (Buse e El-Aneed, 2010).

O elevado polimorfismo dos lipossomas, conseguido através da sua funcionalização, permite em certa medida ultrapassar as desvantagens dos lipossomas convencionais anteriormente mencionadas. A funcionalização destas partículas consiste na modificação da sua superfície pois é com esta que as células contactam e interagem em primeiro lugar. Esta pode ser efetuada através da adsorção ou conjugação de ligandos à superfície das partículas (Bhaskar et al., 2010). Nos possíveis candidatos a ligandos incluem-se substratos de transportadores e recetores expressos nas células que compõem o endotélio da BHE. Anticorpos monoclonais dirigidos a uma determinada proteína expressa nas células endoteliais ou a introdução de transportadores macromoleculares solúveis como polímeros hidrofílicos permitem respetivamente vetorizar e melhorar o tempo de semivida destes sistemas. Uma vez que o principal objetivo é direcionar estes sistemas de transporte de fármacos a um órgão em específico, há que ter conhecimento profundo do órgão alvo, assim como dos mecanismos de transporte envolvidos na sua captação pelos transportadores (Chen e Liu, 2012). A versatilidade conferida a estas partículas através da sua funcionalização permite ainda utilizá-las como sondas de diagnóstico incorporando fluorocromos na extremidade de espaçadores (Figura 5).



**Figura 5** – Multifuncionalidade de lipossomas e nanopartículas (Masserini, 2013).

A peguilação é um processo através do qual moléculas de PEG são adicionadas à superfície de lipossomas ou nanopartículas, ou acopladas a proteínas e fármacos, através de ligações covalentes. Para além da hidrofília conferida por estas moléculas prolongar o tempo de semivida destes sistemas, as cadeias de PEG proporcionam a estabilização estérica da sua superfície prevenindo o seu reconhecimento e opsonização pelo SFM (Veronese e Pasut, 2005). No entanto, também existem inconvenientes associados à peguilação como seja a produção de anticorpos anti-PEG após a primeira administração, reduzindo a eficácia das doses subsequentes (Kaminskas, Mcleod, Porter e Boyd, 2011) e a possibilidade de as cadeias de PEG limitarem a interação dos lipossomas com os recetores alvo, em especial se forem cadeias ramificadas. Em 2009 foi publicado um estudo acerca da toxicidade deste polímero e seus derivados (Webster et al., 2009). Nesta publicação os investigadores reportaram a ocorrência de vacuolização do PEG de baixa MM em células renais após administração prolongada de doses elevadas. Embora tenha sido demonstrado que a sua toxicidade é limitada ao rim e que existe uma larga margem terapêutica entre as doses utilizadas na prática clínica e aquelas que provocam estes efeitos tóxicos, esta evidência tem levado à procura de substitutos do PEG. Surgiram assim novos polímeros biodegradáveis como por exemplo o PLGA e o quitosano.

Prova de que a peguilação é eficaz é a formulação de cloridrato de doxorrubicina encapsulado em lipossomas com metoxiPEG (nome comercial na Europa - Caelyx®;

nome comercial nos Estados Unidos da América (EUA) - Doxil®) cuja comercialização está autorizada pelo Infarmed em Portugal desde 1996 e que é usada *off-label* na prática clínica no tratamento de glioblastomas e tumores metastáticos com resultados satisfatórios, pois de acordo com o resumo das características do medicamento, este encontra-se aprovado para outras indicações terapêuticas (Hau et al., 2004).

Recentemente, em fevereiro de 2013, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), a entidade reguladora do medicamento nos EUA, o primeiro medicamento genérico do Doxil® fabricado pela Sun Pharma Global FZE (disponível em: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm337872.htm>).

A companhia to-bbb que se dedica ao desenvolvimento de novas formulações para o tratamento de doenças neurológicas estuda a veiculação cerebral de fármacos já disponíveis no mercado através de uma técnica denominada de G-Technology®. Esta técnica, desenvolvida pelo *Industrial Technology Research Institute*, em Taiwan, baseia-se na encapsulação de fármacos em lipossomas peguilados que se caracterizam pela conjugação da glutatona às extremidades das moléculas de PEG. A glutatona, um tripéptido linear e antioxidante natural com funções ao nível da inativação de radicais livres e com um papel importante na destoxificação celular, tem acesso ao SNC através de mecanismos específicos de transporte ativo, sendo por isso utilizada como resíduo de vetorização neste sistema. Adicionalmente, o seu uso é benéfico no sentido em que é utilizada como terapêutica de suporte em doenças oncológicas, na SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e na doença de Parkinson e ainda como suplemento alimentar devido às propriedades anteriormente enunciadas (Weperen e Gaillard, s.d.).

De acordo com a informação disponível na página eletrónica desta empresa, estão a decorrer dois ensaios clínicos isolados, de fase I e fase II, respetivamente, envolvendo os fármacos metilprednisolona e doxorrubicina. Para o glucocorticoide cuja formulação lipossómica é designada de 2B3-201 pretende obter-se aprovação para o controlo dos sintomas da esclerose múltipla pela sua potente ação anti-inflamatória. Por outro lado, o produto 2B3-101, constituído pelo antineoplásico doxorrubicina encontra-se em ensaios de fase II e as suas indicações incluem o tratamento de glioblastomas e metástases cerebrais (disponível em <http://www.tobbb.com/Pipeline/Pipeline>). Inclusive, estudos em modelos animais (ratos) de glioblastoma multiforme demonstraram que o 2B3-101 é mais

eficaz na redução do tamanho de tumores cerebrais do que o Doxil®/Caelyx® (Weperen e Gaillard, s.d.).

A tabela IV lista as formulações lipossômicas testadas na veiculação de fármacos ao cérebro e os resultados obtidos. Os medicamentos Ambisome®, Abelcet®, DepoCyte® e Caelyx® estão atualmente disponíveis em Portugal.

Lipossomas catiónicos têm sido vastamente utilizados em terapia génica e na veiculação de citotóxicos como o paclitaxel (Molinari et al., 2007). A interação eletrostática entre os ácidos nucleicos, cuja natureza aniónica é conferida pelos seus grupos fosfato, e os lipossomas originam estruturas designadas de lipoplexos que são facilmente transportados além da BHE (Balazs e Godbey, 2011).

Com a publicação de inúmeros trabalhos nesta área e o crescente e cada vez mais aprofundado conhecimento acerca destes sistemas de partículas prevê-se que haja a consolidação do seu uso na prática clínica, quer no tratamento de doenças oncológicas, cardiovasculares, infecciosas e metabólicas quer no desenvolvimento de vacinas e em terapia génica.

**Tabela IV** – Exemplos de formulações lipossômicas utilizadas no tratamento e diagnóstico de doenças do sistema nervoso central (Garcia-Garcia, Andrieux, Gil e Couvreur, 2005; Gujral e Khatri, 2013).

<b>Substância Ativa</b>	<b>Tipo de Transportador</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>	<b>Via de Administração</b>	<b>Resultados Obtidos</b>
<b>Anfotericina B</b>	Lipossoma (Ambisome®)	Infeções fúngicas do SNC	Intravenosa	Aumento da eficácia do antifúngico e acumulação cerebral
<b>Anfotericina B</b>	Lipossoma (Abelcet®)	Meningite Criptocócica em doentes com SIDA	Intravenosa	Eficácia comparável à Anfotericina B convencional
<b>Citarabina</b>	Lipossoma (DepoCyte®)	Meningite Linfomatosa Maligna	Intratecal	Resposta em 13 de 18 doentes submetidos a tratamento de 29 semanas com DepoCyte® vs 3 de 17doentes tratados com citarabina não encapsulada
<b>Prednisolona</b>	Lipossoma peguilado	Encefalite autoimune	Intravenosa	Diminuição da inflamação e infiltração de macrófagos
<b>Doxorrubicina</b>	Lipossoma peguilado (Caelyx®)	Tumores cerebrais	Intravenosa	Diminuição da toxicidade, maior acumulação em glioblastomas do que em tumores metastáticos
<b>Vetor adenoviral recombinante</b>	Lipossoma catiónico	Tumores cerebrais	Intratumoral	Diminuição da imunogenicidade e manutenção da atividade anticancerígena
<b>Plasmídeo do gene do INF-β</b>	Lipossoma catiónico	Tumores cerebrais	Intratumoral	Inibição do crescimento de glioma maligno resistente
<b>CM-Dil (corante fluorescente)</b>	Lipossoma peguilado conjugado com transferrina	Isquemia	Intravenosa	Aumento da acumulação cerebral

#### **4.1.2.2 Nanopartículas**

O primeiro fármaco veiculado com recurso a nanopartículas foi o hexapéptido dalargina, um análogo da leucoencefalina que apresenta atividade analgésica (Schroeder, Sommerfeld e Sabel, 1998). Desde então variados estudos têm sido publicados em diversos jornais e revistas com impacto científico no sentido dar a conhecer as suas propriedades e múltiplas aplicações, permitindo assim o estudo e desenvolvimento de novas formulações com aplicação terapêutica.

As nanopartículas, tal como os lipossomas, são sistemas coloidais de partículas com dimensões na ordem dos nanómetros, podendo o seu tamanho variar entre os 10 e os 1000 nm e que funcionam em termos de transporte e propriedades como um todo. Parâmetros como o tamanho, carga, grupos funcionais à sua superfície e o material pelo qual são constituídas são utilizados para as definir. As nanopartículas são partículas submicroscópicas formuladas a partir de polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos nos quais os princípios ativos podem ser dissolvidos, encapsulados ou adsorvidos (Tiwari et al., 2012). Vários materiais têm sido utilizados na sua produção destacando-se o copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) e o quitosano, um polissacárido de origem natural (Tabela V). No que respeita à organização e estrutura do polímero podem distinguir-se dois tipos de nanopartículas as nanoesferas e as nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por um núcleo sólido que consiste numa rede polimérica densa. As nanocápsulas por sua vez caracterizam-se por uma cavidade hidrófoba rodeada por um invólucro de polímero e podem ser utilizadas como sistemas de reservatório (Garcia-Garcia et al., 2005). Uma nova entidade desenvolvida e estudada por Vinogradov para a veiculação cerebral de oligonucleotidos são os nanogels (Vinogradov, Batrakova e Kabanov, 1999; Vinogradov, Bronich e Kabanov, 2002; Vinogradov, Batrakova e Kabanov, 2004). Estes sistemas de transporte de fármacos são compostos por ligações cruzadas entre polímeros ionizados como a polietilenoimina (PEI) e cadeias não ionizadas de PEG. A tendência do PEI para colapsar quando associado a um princípio ativo através de interações eletrostáticas faz com que haja uma redução do volume das nanopartículas que o constituem. A sua superfície pode ser personalizada tal como a dos lipossomas e restantes nanopartículas com a introdução de ligandos específicos permitindo assim vetorizar estes sistemas a diferentes órgãos e tecidos do organismo.

As nanopartículas caracterizam-se pela sua capacidade de transportar grandes quantidades de fármaco, poderem ser administradas através de qualquer via e permitirem veicular tanto moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas. Após encapsulação dos fármacos nestes sistemas o seu transporte deixa de depender das suas características físico-químicas e passa a depender apenas das propriedades das nanopartículas. Em resultado da sua extensa área de superfície é possível conjugá-las com várias moléculas do ligando, o que aumenta drasticamente a sua afinidade para os recetores (Petkar, Chavhan, Agatonovik-Kustrin e Sawant, 2011). No entanto, embora com a evolução da nanotecnologia tenha surgido a possibilidade de desenvolver transportadores inteligentes de fármacos com um enorme potencial e vasta aplicação na área da Medicina, modificações pós-administração assim como parâmetros físicos e biológicos estão na origem de algumas das limitações destes sistemas, conforme discutido em seguida.

Investigações recentes demonstram que, em muitos casos, imediatamente após a administração das nanopartículas forma-se à sua superfície uma estrutura denominada de corona que resulta da adsorção de proteínas plasmáticas e que influencia fortemente a sua biodistribuição (Aggarwal, Hall, McLeland, Dobrovolskaia e McNeil, 2009; Dell'Orco, Lundqvist, Oslakovic, Cedervall e Linse, 2010) e é responsável por camuflar os ligandos e grupos funcionais adsorvidos, reduzindo assim a eficácia destes sistemas. A adsorção de moléculas de PEG à superfície destas partículas microscópicas e a inserção do ligando na extremidade das suas cadeias permite estabilizar o sistema impedindo a formação da corona e captação pelo SFM (Villiers, Aramwit e Kwon, 2009).

A elevada concentração das nanopartículas junto ao local de absorção e no seu local de ação, e o tempo de permanência no mesmo, são fatores que influem no sucesso desta estratégia de veiculação de fármacos na medida em que o gradiente de concentração criado facilita a sua penetração no SNC e é necessário tempo para que se dê uma interação entre estas e os recetores expressos no órgão alvo. Deste modo, fatores como a velocidade do fluxo sanguíneo, o efeito de diluição que ocorre após administração das nanopartículas num volume de sangue de aproximadamente 5 L e a velocidade de *turnover* do LCR contribuem para a *clearance* do fármaco do seu local de ação e para a ineficácia de alguns destes sistemas. A falta de biomarcadores específicos e exclusivamente expressos num determinado órgão ou célula, a presença da BHE e a saturabilidade dos transportadores e recetores alvo são também responsáveis pelos seus efeitos tóxicos e reduzidas concentrações alcançadas no cérebro (Krol, 2012).

A neurotoxicidade das nanopartículas traduz-se no bloqueio de canais iónicos, distúrbio das membranas biológicas e inibição de vias de sinalização (Chin et al., 2010; Verma e Stellacci, 2010).

**Tabela V** – Fármacos veiculados com recurso a nanopartículas e principais polímeros utilizados (Kumar, Gupta e Sharma, 2012; Bhaskar et al., 2010).

<b>Fármaco</b>	<b>Tipo de transportador</b>	<b>Polímero</b>
<b>Paclitaxel</b>	Nanopartícula	PGLA
<b>Loperamida</b>	Nanopartícula	PBCA <sup>1</sup>
<b>Temozolamida</b>	Nanopartícula	PBCA <sup>1</sup>
<b>Rivastigmina</b>	Nanopartícula	Quitossano
<b>Estradiol</b>	Nanopartícula	Quitossano
<b>Haloperidol</b>	Micela	Poloxâmero
<b>Paclitaxel</b>	Microesfera	PGLA
<b>5-Fluorouracilo</b>	Microesfera	Poli-malonato de metileno

<sup>1</sup>PBCA – Poli-butil cianoacrilato

Nanopartículas de ouro, sílica e dióxido de titânio atravessam de forma inata a BHE sem recurso à sua funcionalização, contudo a sua citotoxicidade e o destino dos produtos resultantes da sua degradação continuam a ser as principais limitações associadas à sua implementação na prática clínica (Sousa et al., 2010; Wu, Wang, Sun e Xue, 2011; Ze et al., 2013).

Nanopartículas compostas pela ciclodextrina  $\beta$  demonstraram exercer efeito a nível da permeabilidade da BHE. Observou-se que estas partículas possuem a capacidade de extrair moléculas de colesterol das membranas das células da BHE causando alterações na sua fluidez que culminam na abertura das TJ. Através destes sistemas uma elevada percentagem de doxorubicina atingiu o SNC em ensaios realizados *in vitro* (Tilloy et al., 2006).

## 4.2 Transporte mediado por transportadores e recetores endógenos

Para satisfazer as necessidades energéticas do cérebro as células endoteliais da BHE expressam à sua superfície uma variedade de recetores e transportadores que têm como função fornecer ao SNC os nutrientes essenciais ao seu funcionamento. Embora estes transportadores de influxo apresentem alguma seletividade, constituem uma possível via de entrada de fármacos e pró-fármacos no cérebro na medida em que recorrendo ao *design* de moléculas estruturalmente semelhantes aos seus substratos se pode tirar vantagem destes sistemas de transporte de nutrientes nativos da BHE. Em alternativa, existe a hipótese de conjugar o fármaco e o substrato do recetor, mas geralmente esta abordagem não conduz a resultados satisfatórios pois a nova entidade formada não é reconhecida pelo recetor (Pardridge, 2003; Wang, Siahaan e Soltero, 2005). Recetores e transportadores que podem ser utilizados para veicular fármacos ao cérebro, e que têm sido alvo de vários estudos, incluem os transportadores da glucose, aminoácidos, nucleósidos e ácidos monocarboxílicos, e os recetores da insulina, transferrina, toxina da difteria e lipoproteínas (Wang, Siahaan e Soltero, 2005).

O transportador GLUT-1 da glucose representa cerca de 90% dos transportadores da glucose, é expresso cerca de 10 a 50 vezes mais do que um transportador de aminoácidos e está presente em ambos os lados da membrana das células endoteliais da BHE pelo que representa um potencial alvo para o transporte de fármacos (Pardridge, Boado, Black e Cancilla, 1992). Vários estudos *in vitro* foram efetuados recorrendo à glicosilação de fármacos, pró-fármacos e seus derivados. Um estudo efetuado com um pró-fármaco glicosilado do antineoplásico clorambucilo revelou que, ao contrário do esperado, a ligação desta molécula ao transportador GLUT-1 resulta na sua inibição ao invés de ser reconhecida como seu substrato (Halmos, Santarromana, Antonakis e Scherman, 1996). Dois estudos independentes demonstraram que a glicosilação do cetoprofeno, da levodopa e de derivados da dopamina na posição 6 da glucose possuem uma maior afinidade para o transportador GLUT-1 quando em comparação com outras substituições (Fernández et al., 2003; Laine e Gynther, 2008). Verificou-se ainda que análogos opiáceos glicosilados possuem um maior efeito analgésico quando comparados com os não glicosilados; contudo, permanece por esclarecer se este fenómeno se deve a um aumento da sua penetração no SNC mediado pelo recetor GLUT-1 ou se a sua conjugação

com a glucose resulta numa estabilização destas moléculas no sangue (Negri, Lattanzi, Tabacco, Scolaro e Rocchi, 1998).

A levodopa, gabapentina, baclofeno e o melfalano são fármacos que utilizam o transportador LAT-1 (*Large neutral amino acid transporter*) para penetrar no cérebro uma vez que as suas estruturas mimetizam os substratos endógenos (fenilalanina, L-tirosina e leucina) desta proteína (Pardridge, 2012). A levodopa ou L-DOPA, um precursor da dopamina utilizado no tratamento da doença de Parkinson, é o protótipo e exemplo de sucesso de um fármaco que entra no SNC através de um mecanismo de transporte mediado por transportadores expressos na BHE.

Também o transportador de ácidos monocarboxílicos, como o ácido láctico e acético, é expresso em abundância na BHE. Estudos *in vivo* reportam que o ácido salicílico, alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o ácido nicotínico e o ácido benzóico utilizam este mecanismo de transporte para ter acesso ao SNC (Tsuji, 2005). Diversos estudos reportam ainda que o ácido valpróico pode ser veiculado ao cérebro de forma eficiente através deste transportador, o mesmo sucedendo aos inibidores da enzima HMG-CoA redutase (hidroxi-3-methyl-glutaril-coenzima A), fármacos utilizados na redução do colesterol, quando se apresentam na sua forma ácida (Tsuji, Saheki, Tamai e Terasaki, 1993).

Embora o transportador de nucleósidos sódio-dependente pareça ser atrativo para veicular antineoplásicos e antivirais ao cérebro, fármacos como a gencitabina e antivirais como a zidovudina e a zalcitabina apresentam diferentes afinidades para este transportador. A baixa afinidade da zidovudina pode ser justificada pelo facto de este fármaco ser substrato de transportadores de efluxo sendo assim removido dos tecidos neuronais por este mecanismo (Mackey et al., 1999).

Diversos recetores e mecanismos de transporte especializados são expressos à superfície das células endoteliais da BHE garantindo o acesso de macromoléculas essenciais ao desempenho das funções cerebrais. Numa revisão publicada por Gabathuler em 2012, o autor destacou o uso de recetores como o recetor da transferrina (RT), o recetor da insulina (RI), os recetores das lipoproteínas de baixa densidade LPR-1 e 2 (*Low-density lipoprotein receptor*) e o recetor da toxina da difteria (RTD). Embora o transporte de fármacos mediado por estes recetores se tenha revelado uma estratégia promissora e não invasiva de transpor a BHE também tem algumas desvantagens. A principal limitação decorrente da sua utilização são os efeitos sistémicos secundários observados, uma vez

que estes recetores não são expressos exclusivamente a nível cerebral. Em consequência, esta falta de seletividade leva à acumulação indesejada dos fármacos noutros órgãos e tecidos.

#### **4.2.1. Recetor da transferrina**

O RT é um dos recetores mais bem estudados e é expresso em elevadas quantidades na membrana luminal dos capilares do endotélio cerebral, embora também exista à superfície dos hepatócitos, eritrócitos, células intestinais e células imunitárias, como os monócitos. Esta glicoproteína transmembranar possui uma MM de 90 kDa e é composta por duas subunidades com capacidade de transportar quatro moléculas de transferrina na totalidade (Cheng, Zak, Aisen, Harrison e Walz, 2004).

A veiculação de fármacos ao cérebro através do RT pode ser alcançada conjugando o fármaco com o seu substrato, a transferrina, cuja função é transportar o ferro aos diferentes órgãos, ou utilizando anticorpos específicos dirigidos a este recetor (Gabathuler, 2010). A primeira abordagem torna-se impraticável pois, devido às necessidades de ferro do organismo, as concentrações plasmáticas de transferrina são relativamente elevadas, havendo assim competição entre a transferrina e o complexo fármaco-transferrina pelo recetor. Além disso, a transferrina após transcitose é alvo de processamento no interior da célula sendo posteriormente reciclada e novamente devolvida à circulação sanguínea pelo que o seu uso *in vivo* como transportador de fármacos é limitado. Para contornar este problema foram desenvolvidos três anticorpos monoclonais anti RT: o OX26, o R17-217 e o 8D3 (Chen e Liu, 2012). Estes anticorpos ao estabelecerem ligação com um epitopo diferente daquele a que a transferrina se liga não afetam o transporte de ferro para o SNC. Adicionalmente, a sua ligação ao recetor induz a endocitose e a internalização do complexo anticorpo-fármaco. Em Março de 2002 um estudo levado a cabo por investigadores do Departamento de Medicina da *UCLA School of Medicine* revelou que em comparação com o 8D3, o R17-217 é mais seletivo e menos tóxico não tendo sido possível quantificar a sua captação pelas células hepáticas em consequência da sua especificidade para a BHE (Lee, Engelhardt, Lesley, Bickel e Pardridge, 2000). Um sistema desenvolvido para veicular ao cérebro um péptido inibidor

da proteína caspase-3, composto por nanopartículas revestidas por PEG e quitosano, e funcionalizadas com OX26, evidenciou após administração intravenosa aumentar significativamente as concentrações cerebrais destas nanopartículas (Aktaş et al., 2005).

#### 4.2.2 Recetor da insulina

Apesar de ser uma alternativa com um propósito semelhante às anteriores, esta estratégia é considerada arriscada pois pode causar alterações no metabolismo da insulina e na homeostase da glucose. Uma vez que este recetor está envolvido em perturbações metabólicas como a diabetes e a obesidade, e parece sofrer alterações à medida que a doença de Alzheimer progride (Frölich et al., 1998), esta abordagem deve ser utilizada com a devida precaução. Os dois anticorpos monoclonais 83-14 anti-RI específicos da subunidade alfa, um deles totalmente humanizado e o outro quimérico, foram desenvolvidos e testados *in vivo* em ratos e demonstraram ter potencial para transportar fármacos através da BHE (Boado, Zhang, Zhang, Wang e Pardridge, 2008). Um grupo de investigadores dos EUA tem conduzido diversos estudos sobre o uso do RI na veiculação de fármacos ao cérebro e reportaram inclusive que concentrações de insulina na ordem dos 0,5  $\mu\text{mol/L}$ , consideradas elevadas, provocam uma inibição mínima na ligação do anticorpo 83-14 ao RI. Não obstante, não afastam a possibilidade de a administração de doses elevadas de anticorpo resultarem na inibição da ligação da insulina ao seu recetor, tendo observado este fenómeno na presença de concentrações de anticorpo 83-14 entre 0,1 e 1  $\mu\text{g/ml}$  (Pardridge, 2001). Um estudo realizado em macacos Rhesus revelou que, 3h após administração intravenosa, 4% da dose de anticorpo 83-14 ainda se encontrava no cérebro (Jones e Shusta, 2007). Uma sonda de diagnóstico para a doença de Alzheimer formada por um péptido da proteína  $\beta$ -amilóide marcado radioativamente e conjugado com o anticorpo 83-14 foi desenvolvida por Pardridge e seus colaboradores (Wu, Yang e Pardridge, 1997).

### **4.2.3 Recetores das lipoproteínas de baixa densidade LRP-1 e LRP-2**

Tendo por base um mecanismo de transporte mediado por endocitose, semelhante a outros recetores expressos na BHE, estes recetores de sinalização e captação servem de veículo de entrada para o cérebro a múltiplas e variadas substâncias (Dehouck et al., 1997). Os recetores das LDL (*Low-density lipoproteins*) interagem com proteínas e moléculas presentes à superfície de células que circulam na corrente sanguínea como por exemplo as apolipoproteínas E e B, a  $\alpha_2$  macroglobulina, o fator tecidual ativador do plasminogénio, a lactoferrina, a melanotransferrina, o fator VIII da cascata da coagulação e a proteína precursora amilóide (Herz e Strickland, 2001). A grande parte dos estudos que envolvem estes recetores incidem na doença de Alzheimer pois pensa-se que a sua marcada sobreexpressão nas células endoteliais da BHE com o avançar da idade contribui para o desenvolvimento fisiopatológico da doença (Shibata et al., 2000). Todavia, a sua expressão aumentada em glioblastomas (Yamamoto, Ikeda, Ohshima, Tsugu, Kimura e Tomonaga, 1997) e o aumento da incidência destes tumores cerebrais tem motivado o direcionamento das investigações para áreas como a oncologia.

A melanotransferrina, uma sialoglicoproteína que se liga ao LRP para atravessar a BHE, representa um possível vetor de transporte de fármacos. Os resultados da implantação cerebral em ratos de um sistema que conjuga o antineoplásico doxorrubicina com esta proteína, demonstrou aumentar significativamente a sobrevivência dos animais em estudo (Karkan et al., 2008). A alta taxa de transcitose observada após injeção intravenosa da melanotransferrina recombinante P97 associada aos baixos níveis detetados no plasma sugere também uma acumulação cerebral significativa (Demeule et al., 2002).

A lactoferrina, uma glicoproteína com carga positiva pertencente à família da transferrina também tem sido alvo de diversos estudos uma vez que parece estar implicada na patogénese de lesões cerebrais. Os elevados níveis detetados no sangue em indivíduos com doença de Alzheimer e síndrome de Down (Leveugle et al., 1994) ditam que possivelmente existe uma redução do transporte desta proteína pelo LRP em condições inflamatórias, o que constitui uma vantagem pois deste modo o recetor encontra-se livre para estabelecer ligação com o fármaco (Chen e Liu, 2012).

Uma família de péptidos designados por Angiopeps foram desenvolvidos pela empresa biotecnológica AngioChem Inc. e representam, até à data, a tecnologia mais avançada de veiculação de fármacos ao cérebro (Demeule et al., 2008a). Este grupo de ligandos do LRP-1 deriva dos domínios ativos de proteínas humanas como a aprotinina e permite veicular moléculas com dimensões entre os 500 Da e os 150 kDa (Demeule et al., 2008b). Um sistema micelar formulado com o Angiopep-2, o péptido mais bem estudado, foi concebido para veicular ao SNC a anfotericina B através do LRP. Em comparação com micelas convencionais e com a formulação Fungizone®, composta por desoxicolato de anfotericina B, este sistema evidenciou uma maior eficácia *in vivo* e *in vitro* em termos de penetração nos tecidos neuronais (Shao et al., 2010). A sua capacidade de transporte de fármacos através da BHE já tinha sido confirmada previamente num estudo efetuado com dendrímeros (Ke et al., 2009). Também em 2009, a Roche e a Raptor Pharmaceuticals chegaram a um acordo no qual a Roche concordou em colaborar e financiar a investigação de uma tecnologia baseada num derivado da proteína associada ao recetor (RAP – *receptor associated protein*), ligando do LRP (Lee et al., 2007), para avaliar a sua efetividade na veiculação de moléculas ao cérebro (disponível em <http://ir.raptorpharma.com/releasedetail.cfm?releaseid=633940>).

#### 4.2.4 Recetor da toxina da difteria

O recetor da toxina da difteria (RTD) é um recetor transmembranar idêntico e mencionado frequentemente como precursor do fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF), tendo sido detetada a sua expressão em células endoteliais da BHE, neurónios e células da glia (Mishima et al., 1996). A internalização celular de moléculas através deste recetor ocorre via endocitose e em estados inflamatórios, comumente observados em diversas patologias que afetam o SNC, observa-se uma sobreexpressão do RTD. Esta característica fez assim despertar o interesse neste recetor desconhecendo-se a existência de ligandos endógenos desta proteína. Este facto constitui uma vantagem no que respeita à sua utilização na veiculação de fármacos uma vez que deste modo não há competição pela ligação ao recetor nem interferência com o transporte de nutrientes essenciais ao funcionamento cerebral (Gaillard, Brink e Boer, 2005). Apesar de a toxina da difteria se conseguir ligar ao RTD não se recorre à sua utilização *in vivo* uma vez que apresenta uma

elevada toxicidade para o organismo humano. Assim, foi desenvolvido o CMR 197, um análogo não tóxico da toxina da difteria que ao ser conjugado com nanopartículas contendo fármacos ou agentes de diagnóstico pode ser utilizado no tratamento de doenças neurológicas, mas também como ferramenta de diagnóstico na medida em que pode fornecer imagens cerebrais dos locais afetados por processos inflamatórios permitindo assim avaliar a extensão dos danos neurológicos e o prognóstico e evolução de diversas patologias (Kaefer, Vemulapalli e Freeman, 2000).

Além das desvantagens anteriormente referidas, outra das limitações desta estratégia está relacionada com o facto de estes sistemas terem uma capacidade de transporte finita (processo saturável) e variável entre diferentes tipos de transportadores. Ao serem expressos em vários órgãos do corpo humano e em percentagem variável na BHE é espectável que o mesmo fármaco veiculado por dois transportadores distintos atinja concentrações díspares no SNC (Uchida, Ohtsuki, Katsukura, Ikeda, Suzuki, Kamiie e Terasaki, 2011).

Ainda assim, apesar do escasso sucesso obtido até à data, os transportadores GLUT-1 e LAT-1 possuem uma grande capacidade de transporte possibilitando a veiculação de fármacos ao cérebro. Esta abordagem é reconhecida pela comunidade científica como uma das estratégias mais promissoras e com maiores hipóteses de sucesso, existindo, no entanto, a necessidade de desenvolvimento de formulações mais eficazes.

#### 4.2.1 Inibição de transportadores de efluxo

A gpP, produto do gene MDR (*multidrug resistance*) é uma proteína expressa à superfície da membrana luminal das células que funciona como uma bomba de efluxo promovendo de forma seletiva a saída de xenobióticos e produtos do metabolismo celular do interior destas através de um mecanismo de transporte ativo (Fardel, Lecureur e Guillouzo, 1996). Descoberta em 1976 em células de ovário de hamster chinês, foi identificada em células endoteliais da BHE em 1980 (Juliano e Ling, 1976; Cordon-Cardo et al., 1989). É um dos principais e mais bem estudados transportadores de efluxo possuindo um papel significativo na resistência de alguns tumores cerebrais à quimioterapia, embora seja expresso em condições não patológicas no rim, fígado e células gastrointestinais (Thiebaut et al., 1987). Na medida em que esta proteína é expressa em maior quantidade em glioblastomas e em metástases cerebrais (Demeule et al., 2001), limitando o acesso de fármacos ao seu interior, a administração de inibidores da gpP, juntamente com o esquema quimioterapêutico, representa uma possível abordagem terapêutica em câncers que se revelam resistentes aos tratamentos instituídos. Alguns dos substratos e inibidores da gpP são mencionados na Tabela VI. Fármacos inibidores da gpP clinicamente testados incluem o verapamil, a ciclosporina, a quinidina, o probenecid e a indometacina (Deeken e Löscher, 2007).

**Tabela VI** – Substratos, inibidores e indutores da glicoproteína P (Azeredo, Uchôa e Costa, 2009).

Substratos	Inibidores	Indutores
Digoxina, Dexametasona, Domperidona Carbamazepina, Amitriptilina, Paracetamol Clorpromazina, Risperidona, Tamoxifeno Etopósido, Docetaxel, Doxorrubicina Metotrexato, Mitoxantrona, Morfina Bromocriptina, Loperamida, Azitromicina ARAs, BECs <sup>2</sup> , Bloqueadores $\beta_1$	Antifúngicos, Tacrolimus Diltiazem, Verapamil, Amiodarona Vinblastina, Vincristina, Estramustina Fluoxetina, Desipramina, Fluvoxamina Ivermectina, Triptanos, Midazolam Estatinas, Inibidores das proteases Haloperidol, Omeprazol, Claritromicina	Hipericão (Erva de São João) Rifampicina

<sup>2</sup>ARAs – Antagonistas dos Recetores da Angiotensina: Losartan; BECs – Bloqueadores da Entrada de Cálcio: Nitrendipina, Nifedipina, Nicardipina

O zosuquidar (LY335979), tariquidar (XR9576), laniquidar (R101933), biricodar (VX-710) são compostos de síntese química especificamente desenhados para inibir a gpP com indicação terapêutica no tratamento adjuvante em neoplasias resistentes à quimioterapia. *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), *Multidrug Resistance Protein* (MPR) e *Multi-specific organic anion transporter* (MOAT) são outros transportadores de efluxo pertencentes à superfamília de transportadores ABC expressos na BHE e em várias doenças oncológicas que diminuem a sensibilidade das células cancerígenas à quimioterapia. Assim, a administração de inibidores da gpP não seletivos como o tariquidar e biricodar pode ser vantajosa nestes casos (Minderman, O’Loughlin, Pendyala e Baer, 2004; Kannan et al., 2011).

Estudos realizados em animais têm revelado resultados animadores. Num estudo efetuado em ratos observou-se um aumento das concentrações cerebrais de vinblastina e do metabolito ativo da morfina (morfina-6-glucoronídeo) após administração de valspodar (PSC 833) e elacridar (GF 12091), ambos inibidores da gpP (Cisternino, Rousselle, Dagenais e Scherrmann, 2001). Numa outra investigação, a coadministração de valspodar por via oral e de paclitaxel por via intravenosa demonstrou ser mais eficaz do que o tratamento em monoterapia. Além desta associação ter resultado num aumento das concentrações cerebrais de paclitaxel, verificou-se ainda uma redução de aproximadamente 90% do volume do tumor (Fellner et al., 2002). Porém, os ensaios clínicos têm sido decepcionantes e apesar de se terem obtido resultados promissores num ensaio de fase II que pretendia testar o efeito dos inibidores da gpP em tumores sólidos e em neoplasias do foro hematológico, os ensaios de fase III tiveram de ser interrompidos precocemente devido à elevada toxicidade observada. São assim necessários mais estudos para avaliar a segurança do uso destes fármacos na prática clínica para que esta estratégia seja bem-sucedida.

### 4.3 Veiculação de fármacos com recurso a células

Recorrendo a uma abordagem mais fisiológica, a alternativa de veicular fármacos ao cérebro através de células do sistema imunitário, como os monócitos, surgiu após a descoberta da capacidade destas células atravessarem naturalmente a BHE em condições não patológicas (Séguin, Biernacki, Rotondo, Prat e Antel, 2003). Hoje em dia sabe-se que em doenças como a esclerose múltipla, Alzheimer e tumores cerebrais há um recrutamento de células imunológicas (como monócitos e macrófagos) ao local da inflamação, motivo pelo qual esta estratégia possui um grande potencial (Vyas e Khar, 2007). Os recetores expressos à superfície destes transportadores celulares ao interagirem com recetores presentes na BHE fazem com que as células penetrem no cérebro através de endocitose. Assim, os monócitos, que têm como vantagem a sua biocompatibilidade inata e natural com o organismo humano, podem ser utilizados de várias formas no tratamento de doenças neurológicas.

Por um lado, podem ser utilizados como veículo de transporte de antineoplásicos e de outras moléculas usadas no tratamento de patologias do SNC que, ao serem encapsuladas em transportadores coloidais de partículas e incorporados no interior destas células, funcionam de forma semelhante ao cavalo de Troia, uma vez que a célula lhes serve de escudo e lhes confere proteção contra o SFM. Um estudo publicado em 2003 no *International Journal of Pharmaceutics* sugere que lipossomas com propriedades magnéticas e lipossomas carregados negativamente têm potencial para veicular fármacos a regiões cerebrais inacessíveis em patologias inflamatórias através de monócitos e neutrófilos (Jain et al., 2003). Num estudo efetuado em ratos e coelhos, a incorporação de lipossomas carregados negativamente contendo serotonina (um fármaco ao qual a BHE é impermeável) em monócitos demonstrou ser eficaz na veiculação deste neurotransmissor ao SNC na medida em que foram atingidas concentrações cerebrais duas vezes superiores aquelas observadas após a administração do fármaco livre (Afergan et al., 2008). Foi também reportado que a administração intravenosa *in vivo* de agentes de contraste através de nanopartículas de óxido de ferro resultou numa maior deteção de zonas de infiltrados de macrófagos em várias patologias do SNC (Neuwelt et al., 2004; Manninger et al., 2005).

Por outro lado, os monócitos podem veicular aos focos de inflamação fármacos anti-inflamatórios, ou fármacos da classe dos bifosfonatos que induzem apoptose dos monócitos e macrófagos, na tentativa de reduzir o processo inflamatório (Van Rooijen e Sanders, 1998; Kelly, Jefferies e Cryan, 2011). Existe ainda a possibilidade de se recorrer ao *design* de nanopartículas que mimetizem monócitos ativados como demonstra um estudo recente. Nanopartículas porosas de sílica revestidas com membranas celulares purificadas de leucócitos demonstraram interagir com recetores das células endoteliais da BHE e apresentaram uma reduzida *clearance* pelo SFM (Parodi et al., 2013). Diversos autores propõem ainda o uso dos monócitos como vetores em terapia génica no tratamento da doença de Alzheimer (Lebson, 2008; Malm, Koistinaho, Muona, Magga e Koistinaho, 2010).

Do mesmo modo que os monócitos, também os linfócitos e os eritrócitos são considerados por alguns investigadores potenciais transportadores de fármacos a células cancerígenas (Steinfeld, Pauli, Kaltz, Bergemann e Lee, 2006; Muzykantov, 2010). Contudo, com o aparecimento de doenças infecciosas como as hepatites B e C e a SIDA, transmitidas através do sangue e seus derivados, estas abordagens foram colocadas em segundo plano devido aos riscos que acarretam. Apesar desta colossal desvantagem, o uso de monócitos como transportadores de fármacos permite veicular elevadas quantidades de fármaco ao cérebro e bloquear uma das principais vias de acesso dos patógenos ao SNC.

Embora seja uma área ainda por explorar, a implantação cerebral de tecidos biológicos é outra estratégia que permite, em teoria, veicular fármacos ao cérebro. Baseando-se na libertação do fármaco desejado pelo tecido transplantado e geneticamente modificado, esta abordagem tem sido investigada para a doença de Parkinson. A principal desvantagem deste método deve-se ao facto de o tecido ter um tempo de sobrevivência reduzido devido à falta de vascularização (Misra et al., 2003).

Conclui-se assim que apesar dos resultados serem bastante promissores e de estas estratégias possuírem um elevado potencial na veiculação de fármacos ao cérebro, são necessários mais estudos sobre a sua segurança e efeitos indesejáveis.

#### 4.4 Disrupção da barreira hematoencefálica

A disrupção da BHE é um fenómeno que ocorre naturalmente em doenças inflamatórias crónicas e em doenças cancerígenas mas que pode também ser induzido intencionalmente através de diferentes técnicas (Rosenberg, 2012). Esta abordagem baseia-se essencialmente no facto de algumas substâncias, nomeadamente agentes de contraste e ultrassons, solventes químicos ou mesmo determinados fármacos provocarem uma alteração transitória na permeabilidade da BHE. O mecanismo responsável pela alteração de permeabilidade é variável consoante a técnica utilizada; no entanto algumas das limitações transversais a quase todos estes métodos residem no facto de serem métodos relativamente dispendiosos, requererem a hospitalização do doente e serem invasivos, necessitando de anestesia geral (Gabathuler, 2010). Como efeitos adversos comuns podem ocorrer danos neuronais permanentes e irreversíveis e convulsões devido à entrada de substâncias nocivas e de microrganismos patogénicos na circulação cerebral, juntamente com o fármaco. Estes efeitos indesejáveis devem-se à perda de seletividade da BHE no que concerne às substâncias que penetram no SNC por disrupção das TJ e alteração da homeostase do ambiente neuronal. Como referido anteriormente, também algumas patologias como a hipertensão arterial ou a toma de fármacos antipsicóticos e antidepressivos podem por si só alterar o normal funcionamento da BHE.

A disrupção da BHE representa uma técnica eficaz no tratamento de alguns tumores cerebrais. Contudo, sabe-se que o aumento do transporte paracelular de moléculas é limitado, uma vez que a abertura das TJ apenas permite a passagem de moléculas com tamanho molecular na ordem dos 20 nm (Adamson et al., 2004; Treat, McDannold, Zhang, Vykhodtseva, e Hynynen, 2012). Foram reportados casos de disseminação de tumores cerebrais, mesmo após se ter conseguido ultrapassar a BHE, pelo que esta abordagem deve ser aplicada com precaução (Gabathuler, 2010). Embora não represente um método padrão na veiculação de fármacos ao cérebro, de acordo com a *American Brain Tumor Association* a disrupção da BHE é considerada uma técnica inovadora no tratamento de neoplasias cerebrais.

A seguir apresentam-se as diversas abordagens usadas na disrupção da BHE.

#### **4.4.1 Disrupção farmacológica**

A disrupção da BHE após a administração sistémica de certos fármacos é favorecida pelo facto de algumas moléculas terem a capacidade de alterar temporária e reversivelmente a permeabilidade cerebrovascular tendo sido justificado este fenómeno através de uma interação física entre o fármaco e elementos do endotélio que compõe a BHE (Mohanachandran et al., 2012).

O etopósido, um antineoplásico utilizado no tratamento de carcinomas sólidos como tumores testiculares e tumores das células pequenas do pulmão, demonstrou exercer um efeito dose dependente na permeabilidade da BHE num estudo realizado em ratos após administração intracarotídea de doses de 3, 15 e 22,5 mg de fármaco por kg de peso corporal. A duração do efeito provocado pelo fármaco demonstrou também ser diretamente proporcional à dose administrada, variando entre menos de 24h para doses de 3mg/kg e 72 a 96h para doses na ordem dos 22,5mg/kg. Uma vez que o etopósido é uma molécula insolúvel em água, é formulado numa mistura de solventes que incluem o polissorbato ou Tween 80, o PEG, o ácido cítrico, o etanol e o álcool benzílico, pelo que para demonstrar a eficácia do antineoplásico na disrupção da BHE se procedeu à avaliação dos efeitos do fármaco e da formulação disponível no mercado, patenteada pela Bristol-Myers Squibb e cujo nome comercial é Etopophos®, isoladamente. A administração da mistura de solventes isoladamente revelou exercer um efeito mínimo na permeabilidade da BHE em comparação com o efeito observado após administração de Etopophos® (Spigelman, Zappulla, Johnson, Goldsmith e Malis, 1984). Assim, embora o mecanismo pelo qual este fármaco afeta a BHE permaneça desconhecido parece existir evidência de que os constituintes da formulação, particularmente o Tween 80 e o PEG (Pardridge, 2005), exercem também algum efeito e potenciam a ação do etopósido sobre a BHE. Quatro dias após a administração de etopósido não se observou edema, inflamação, hemorragia ou degeneração neuronal em nenhum dos animais intervencionados, conquanto em 2 dos animais submetidos ao procedimento se tenha verificado a existência de infiltrados linfocíticos no hemisfério cerebral esquerdo. Foram ainda descritas uma maior apatia e letargia nos animais que receberam doses mais elevadas do fármaco (Spigelman et al., 1986).

MacDonell reportou que a administração intravenosa do antineoplásico 5-fluorouracilo (5FU) em gatos causou uma disrupção localizada da BHE (MacDonell, Potter e Leslie, 1978). Apesar do grupo de investigadores liderado por Neuwelt (1983) não ter conseguido reproduzir o mesmo efeito em ratos, demonstrou que a infusão intracarotídea de cisplatina em cães provocava uma alteração na permeabilidade da BHE, embora associada a dano do parênquima cerebral (Neuwelt et al., 1983; Neuwelt, Glasberg, Frenkel e Barnett, 1983). Cerca de 1 ano mais tarde Feun e a sua equipa evidenciaram que a hidroxiureia, após administração intracarotídea, possui também a capacidade de modificar e interferir no normal funcionamento da BHE (Feun, Savaraj, Lu, Fields, Sutton e Too, 1984).

Alguns fármacos e substâncias capazes de alterar a permeabilidade da BHE encontram-se listados na Tabela VII, sendo que na sua maioria pertencem ao grupo farmacoterapêutico dos agentes antineoplásicos.

**Tabela VII** – Fármacos e substâncias que provocam a disrupção da barreira hematoencefálica.

<b>Fármaco/ Substância</b>	<b>Grupo Farmacoterapêutico</b>	<b>Mecanismo de disrupção</b>	<b>Referência</b>
<b>Etopósido</b>	Antineoplásico Inibidor da Topoisomerase II	Desconhecido	(Spigelman et al., 1986)
<b>Cisplatina</b>	Antineoplásico Agente alquilante	Desconhecido	(Namikawa et al., 2000)
<b>Melfalano</b>	Antineoplásico Agente alquilante	Interação com LAT-1 na BHE	(Killian , Gharat e Chikhale, 2000)
<b>Hidroxiureia</b>	Antineoplásico Antimetabolito	Indução NO sintetase, ↑ NO	(Cokic et al., 2006)
<b>Fluorouracilo</b>	Antineoplásico Antimetabolito	↑ Atividade pinocítica, Disrupção TJ	(MacDonell et al., 1978)
<b>Protamina</b>	Antídoto da Heparina	↑ Transporte Vesicular/Endocitose	(Vorbrodt, Dobrogowska, Ueno e Lossinsky, 1995)

Embora seja considerada por alguns autores uma forma de alterar a permeabilidade da BHE e existam estudos em animais que comprovam a sua eficácia, desconhece-se a realização de ensaios em humanos e não existe registo ou reporte acerca da sua utilização na prática clínica diária. Esta técnica envolve o uso de substâncias muito tóxicas aplicadas no tratamento de neoplasias e com efeitos adversos bastante graves, pelo que, uma vez

que os seus benefícios não superam os riscos, não se justifica a sua utilização. Ainda assim, quando na presença de tumores ou metástases cerebrais pode ser vantajoso utilizar no seu tratamento algumas destas substâncias caso tenham indicação para o tipo de neoplasia em causa. Seria deste modo interessante analisar até que ponto a administração destes fármacos em doentes oncológicos contribui para o aparecimento de metástases cerebrais uma vez que os próprios fármacos alteram as propriedades da BHE.

#### **4.4.2 Disrupção osmótica**

Rapoport et al, em 1972, observaram que o corante azul de Evans ficava retido no SNC após a administração de uma solução hipertónica de arabinose. Dado que este corante possui elevada afinidade para a albumina plasmática não era espectável que atravessasse a BHE, pelo que se atribuiu o fenómeno observado à solução hipertónica administrada *a priori*. Foi deste modo que surgiu o conceito e foi introduzida a disrupção osmótica da BHE (Rapoport, Hori e Klatzo, 1972). No entanto, só 7 anos mais tarde, em 1979, foram realizados por Neuwelt e a sua equipa os primeiros ensaios clínicos de fase I e, desde então, o seu grupo lidera a investigação nesta área juntamente com outras instituições sob alçada do *International Blood-Brain Barrier Disruption Consortium*. Apesar de invasiva, esta técnica constituiu um paradigma na veiculação de fármacos ao cérebro (Kroll e Neuwelt, 1998).

Quando as células são colocadas em contato com um agente hipertónico verifica-se que ocorre uma retração do seu volume devido à perda de água por osmose, observando-se um fenómeno que se denomina de plasmólise (Pilizota e Shaevitz, 2013). Este é o mecanismo subjacente a esta técnica de disrupção da BHE. A perda de água por parte das células que constituem o endotélio da BHE e a pressão osmótica gerada originam alterações citoesqueléticas nas mesmas levando à separação do domínio extracelular das proteínas que constituem as TJ (McDannold, Vykhodtseva e Hynynen, 2008; Chopra, Gulati, Saluja, Pathak e Bansal, 2008). Observam-se também alterações ao nível dos microtúbulos das células que conduzem à abertura das TJ e, ao invés do que acontece numa situação normal, formam-se espaços entre as células e dá-se a passagem de moléculas provenientes do sangue para os tecidos neuronais (Rapoport, 2000).

Esta estratégia compreende a administração de uma solução hipertônica seguida da infusão do fármaco numa das artérias carótidas internas ou numa das artérias vertebrais, podendo ainda administrar-se ambas as soluções diretamente numa artéria cerebral. Soluções hipertônicas de manitol, arabinose, lactamida, ureia, cloreto de sódio e agentes de contraste usados em radiologia, podem ser utilizados para alterar transitoriamente a permeabilidade da BHE (Kemper, Boogerd, Thuis, Beijnen e Van Tellingen, 2004). Solventes como o dimetilsulfóxido e o etanol, e metais como o alumínio, embora interessantes do ponto de vista fisiológico são muito tóxicos pelo que o seu uso na prática clínica se torna impraticável. No passado também soluções de polissorbato 80 foram utilizadas com o mesmo objetivo, uma vez que foi colocada a hipótese de este tensioativo provocar uma alteração momentânea da BHE devido às elevadas concentrações do mesmo detetadas no cérebro (Pardridge, 2005). Em 2013 um estudo revelou que além das propriedades demonstradas na disrupção da BHE, a administração de manitol parece interferir com a agregação de uma proteína envolvida na fisiopatologia da doença de Parkinson de etiologia genética. Assim sugere-se que o manitol pode ser utilizado como duplo agente terapêutico no tratamento desta patologia (Shaltiel-Karyo et al., 2013). De acordo com a literatura, a duração do efeito provocado por estas substâncias na BHE varia entre 20 a 40 minutos, podendo, segundo alguns autores, prolongar-se por algumas horas, período durante o qual o fármaco pode difundir livremente através da BHE (Neuwelt e Dahlborg, 1989; Siegal et al., 2000).

Após a aplicação de anestesia geral seguem-se 7 passos principais descritos na Tabela VIII.

Embora a anatomia e vasculatura cerebral possam diferir entre indivíduos sabe-se que a perfusão cerebral é assegurada por 4 artérias principais, as artérias carótidas internas e as artérias vertebrais. No entanto, é necessário que antes da primeira sessão de tratamento se determine de forma precisa a anatomia cerebral através de uma angiografia. Uma vez que este procedimento requer anestesia geral deve ser realizado em hospital e por profissionais qualificados. Durante a anestesia a pressão arterial e a frequência cardíaca devem ser monitorizadas pois sabe-se que alterações hemodinâmicas têm impacto no sucesso da disrupção (Fortin e Neuwelt, s.d; Doolittle et al., 2000).

**Tabela VIII** – Procedimento de disrupção osmótica da barreira hematoencefálica (Adaptado de Bellavance, Blanchette e Fortin, 2008).

1	Cateterização através de punção transfemoral da artéria carótida interna direita ou esquerda ou da artéria vertebral direita ou esquerda
2	Determinação da taxa de infusão (ml/30 seg.) da solução hipertónica por fluoroscopia e injeção de agente de contraste iodado
3	Administração concomitante de medicação anticonvulsivante e de fármacos estabilizadores da função cardíaca e neuroprotetores
4	Disrupção osmótica após administração de 25% da solução hipertónica. Observação e monitorização de sinais relevantes - Dilatação bilateral da pupila, taquicardia e hipertensão
5	Injeção intra-arterial de agente de contraste - Confirmação do posicionamento do cateter
6	Infusão intra-arterial do fármaco
7	Fim do procedimento. Transferência do paciente para o recobro. Avaliação do estado neurológico e de consciência até recuperação total e alta

Alguns fatores que podem influenciar a eficácia deste procedimento incluem a variabilidade interindividual e intraindividual, as variações hemodinâmicas, o agente anestésico utilizado, bem como a taxa de perfusão da solução hipertónica (Remsen et al., 1999). A escolha do anestésico é particularmente importante, uma vez que algumas substâncias possuem efeitos hemodinâmicos que podem ter impacto negativo na qualidade da técnica, como é o caso da cetamina. Em animais, o propofol é o anestésico de primeira de escolha pois possui também propriedades anticonvulsivantes e demonstrou exercer efeitos ao nível da proteção cerebral e maximização da eficácia da disrupção (Remsen et al., 1999; Martin, Maris, Ehtesham e Singer, 2012).

No caso de tumores cerebrais, o aumento transitório da pressão intracraniana e o facto de o agente anti tumoral ser pouco seletivo e, portanto, afetar também células saudáveis representam os efeitos adversos mais relevantes. Outros efeitos adversos que poderão advir compreendem complicações relacionadas com o cateter ou com o próprio procedimento de disrupção e incluem hematoma pós-cateterização ao nível da virilha, trombose do vaso parental que pode conduzir a incapacidade neurológica, convulsões e ocorrência de hérnia cerebral, a complicação mais séria (Doolittle et al., 2000).

O facto de a disrupção osmótica não ser específica, quer por não se conseguir controlar a sua extensão, quer por não se conseguir restringi-la apenas a uma zona particular do cérebro, representa a principal desvantagem deste método. Investigadores da República Checa que já tinham reportado que a disrupção osmótica podia resultar na perda da

integridade da mielina, substância que reveste os axónios dos neurónios e acelera a transmissão do impulso nervoso, publicaram recentemente um estudo em que demonstram que este procedimento leva também a um aumento do conteúdo aquoso do cérebro originando edema (Kozler, Riljak e Pokorný, 2013).

As contraindicações para a realização desta técnica incluem patologias vasculares intra-arteriais significativas, bloqueio da medula espinal por tumor ou risco acrescido relacionado com procedimentos anestésicos (Neuwelt, 1989).

Os resultados de um ensaio clínico de fase I realizado em 13 pacientes com tumores oligodendrogliais agressivos (oligodendrogliomas e oligoastrocitomas), cujo tratamento com temozolamida não foi eficaz, revelaram-se animadores. A disrupção osmótica da BHE seguida da administração intra-arterial de carboplatina e melfalano e da administração intravenosa de etopósido, demonstrou ser eficaz especialmente em doentes com mutações no cromossoma 19 e revelou uma toxicidade aceitável considerando a administração conjunta dos três antineoplásicos (Guillaume et al., 2010). Estão, inclusive, a decorrer ensaios clínicos de fase I e II nos EUA que têm como objetivo avaliar a eficácia e segurança do tratamento de tumores do SNC com melfalano e carboplatina após disrupção osmótica da BHE induzida por soluções hipertónicas de manitol (disponível em [www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=656297&version=HealthProfessional](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=656297&version=HealthProfessional)).

#### **4.4.3 Disrupção química**

Recorrendo a um mecanismo diferente da técnica anteriormente descrita, este método é também por vezes denominado de disrupção bioquímica pois consiste na interação entre uma estrutura biológica, um transportador presente ao nível da BHE por exemplo, e uma molécula de síntese que pretende mimetizar uma determinada substância produzida endogenamente. Enquanto alguns autores inserem nesta classificação a disrupção farmacológica outros optam por abordá-la em separado, tal como apresentado na presente monografia. Apesar de as diferenças entre estas duas técnicas serem bastante ténues, as suas características são distintas na medida em que na disrupção farmacológica se utilizam apenas moléculas de síntese química aplicadas no tratamento de diversas patologias e se tira partido da sua interação com elementos da BHE e na disrupção química recorre-se a análogos de moléculas produzidas naturalmente pelo organismo.

Com o conhecimento cada vez mais profundo dos mecanismos envolvidos na regulação da BHE surgiram proteínas, enzimas e lípidos com potencial aplicação na prática clínica. A maioria dos agentes químicos utilizados neste método são derivados de compostos vasoativos e mediadores inflamatórios como a bradicinina, a histamina, os leucotrienos, o NO, o fator de crescimento do endotélio vascular e outras citoquinas (Black e Chio, 1992; Inamura e Black, 1994; Gutman et al., 1996). Sabe-se que estas moléculas possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade da BHE de forma dose e tempo dependente; todavia, são rapidamente metabolizadas e induzem taquifilaxia se administradas em doses consecutivas e por longos períodos de tempo. Outras limitações no uso destas substâncias são as suas estreitas margens terapêuticas e o facto de os seus efeitos adversos serem dose-dependente (Wang, Siahaan e Soltero, 2005).

Na tentativa de se contornar e ultrapassar os problemas associados a estes compostos modificou-se a sua estrutura criando-se assim análogos destas substâncias com características mais favoráveis à sua utilização na prática clínica. A substituição de apenas alguns aminoácidos da proteína bradicinina resultou num aumento do seu tempo de semivida e numa maior estabilidade e seletividade da molécula para o seu recetor. Observou-se também uma menor ocorrência de efeitos adversos e uma maior reprodutibilidade e consistência no seu efeito, tendo sido ainda determinado que o tempo necessário para o seu início de ação e o tempo necessário para se restabelecer a

permeabilidade da BHE após a sua administração é de 5 minutos aproximadamente. Este análogo sintético e agonista do recetor da bradicinina B2, denominado de RMP-7 (*receptor-mediated permeabilizer*) ou Lobradimil e cujo nome comercial era Cereport®, chegou a ensaios clínicos de fase II e III e, apesar da evidência demonstrada ao nível da disrupção das TJ, a sua investigação foi abandonada devido à inconsistência dos resultados dos ensaios clínicos de fase II (Dean, Emerich, Hasler e Bartus, 1999; Borlongan e Emerich, 2003). Embora o Cereport® tenha falhado em demonstrar a sua eficácia e o seu potencial no tratamento de gliomas, quando associado a antineoplásicos (Warren et al., 2006), continua a ser uma ferramenta útil na veiculação de fármacos ao cérebro. Diversos estudos demonstraram a sua capacidade de aumentar as concentrações de analgésicos opióides como a loperamida (Emerich, Snodgrass, Pink, Bloom, e Bartus, 1998) e de antivíricos como o aciclovir (Bidanset et al., 2001) no SNC, traduzindo-se estes resultados em efeitos positivos na perceção da dor e numa redução da carga viral a nível cerebral.

Uma outra forma de modificar a permeabilidade da BHE e aumentar as concentrações de fármacos no cérebro requer a administração sistémica de alquilgliceróis. Embora o seu mecanismo de ação permaneça por esclarecer, em 2003, um grupo de investigadores alemães (Erdlenbruch et al., 2003) revelou que, de forma reversível e dependente da dose, os alquilgliceróis conseguem aumentar a biodisponibilidade cerebral de diversos antineoplásicos e de alguns antibióticos. No mesmo estudo foi ainda possível apurar que a estrutura e comprimento dos grupos alquilo e o número de moléculas de glicerol presentes na molécula parecem ter influência na qualidade da disrupção. A biodisponibilidade de fármaco no cérebro após administração sistémica de alquilgliceróis revelou ser diretamente proporcional ao tamanho da sua cadeia e inversamente proporcional ao número de moléculas de glicerol. Embora a eficácia da disrupção seja comparável à disrupção osmótica, demonstrou ser superior à observada após administração de Cereport®. Apesar de os resultados em ratos serem animadores, de acordo com a literatura disponível, ainda não foram iniciados ensaios clínicos em humanos para avaliar a sua mais-valia na veiculação de fármacos ao cérebro (Wang, Siahaan e Soltero, 2005). No entanto, diversos estudos evidenciam o seu potencial terapêutico e aplicação em várias áreas da Medicina (Iannitti e Palmieri, 2010).

Outras abordagens e inovações relevantes nesta área são apresentadas na tabela que se segue.

**Tabela IX** – Moduladores das *tight junctions* e outras substâncias que alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Adaptado de Deli, 2009).

	<b>Substâncias</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Referência</b>
<b>Agentes quelantes</b>	EDTA, EGTA <sup>3</sup>	Disrupção TJ e AJ ↓Ca <sup>2+</sup>	(Tomita, Hayashi e Awazu, 1996)
<b>Ácidos Gordos (AG), AG modificados, Fosfolípidos</b>	Ácido oleico, Hexanoato de sódio, Éster de carnitina, LPA <sup>4</sup>	Redistribuição das proteínas das TJ, Formação de micelas	(Schulze, Smales, Rubin e Staddon, 1997) (Notman, Noro e Anwar, 2007)
<b>Tensioativos</b>	SDS <sup>5</sup> , Sais biliares	Reorganização da actina, ↓ e ↑ Ca <sup>2+</sup>	(Anderberg, Lindmark e Artursson, 1993) (Lin et al., 2007)

<sup>3</sup>EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético; EGTA – Ácido etileno glicol tetra-acético

<sup>4</sup>LPA – Ácido lisofosfatídico

<sup>5</sup> SDS – Dodecil sulfato de sódio

Em contraste com as desvantagens apresentadas pelos outros métodos de disrupção, esta técnica caracteriza-se por uma maior seletividade e, em consequência, uma menor incidência de efeitos adversos (Chio, Baba, e Black, 1992). Uma vez que se recorre à administração de análogos de moléculas endógenas, observa-se que os tecidos e capilares neuronais saudáveis não parecem ser afetados pelas mesmas.

#### 4.4.4 Disrupção física

A disrupção física da BHE e o sucesso deste procedimento assentam essencialmente na capacidade dos ultrassons, através de mecanismos físicos e biológicos, produzirem alterações na permeabilidade da BHE. Sendo um método que oferece inúmeras vantagens existe um número crescente de publicações e estudos nesta área com resultados bastante promissores (Burgess e Hynynen, 2013). Embora o sistema ExAblate® Neuro (InSigtec), que conjuga a aplicação de ultrassons e ressonância magnética guiada, apenas esteja aprovado na Europa para o tratamento da doença de Parkinson e da dor neuropática, ele oferece uma solução viável para a veiculação de fármacos ao cérebro. Este protótipo para aplicação clínica de ultrassons já foi utilizado em suínos e primatas não tendo sido registadas alterações comportamentais ou cognitivas. A *Focused Ultrasound Foundation* está inclusive a recrutar pacientes para ensaios clínicos para testar a utilização de ultrassons no tratamento de tumores cerebrais, demonstrando assim que encoraja a investigação nesta área, propondo ainda a criação de grupos de estudo dedicados ao tema. (disponível em <http://www.fusfoundation.org/diseases-and-conditions/brain-disorders/brain-tumor>).

Os ultrassons são ondas mecânicas com frequência superior àquela que o ouvido humano consegue captar. Possuem frequências na ordem dos 20 kHz e são gerados por materiais piezoelétricos com características mecânico-elétricas ímpares, que em resposta a uma pressão mecânica produzem energia elétrica. Hoje em dia são amplamente utilizados nas mais diversas áreas, nomeadamente em Medicina Veterinária e em Medicina Humana, principalmente em ecografias e tratamentos estéticos, destacando-se o seu uso quer como ferramenta de diagnóstico quer como agente terapêutico.

O potencial dos ultrassons para induzir alterações de permeabilidade na BHE, sem afetar os tecidos adjacentes, foi evidenciado pela primeira vez nos anos 60 através de um estudo publicado no *Journal of Neurology* (Ballantine, Bell e Manlapaz, 1960). Mais recentemente, investigações realizadas pela *Harvard Medical School* revelaram que a aplicação de ultrassons numa região específica do crânio associada à administração intravenosa de um agente de contraste que tem na sua constituição microbolhas de gás provoca uma disrupção transitória, reversível e localizada da BHE (Hynynen, McDannold, Vykhodtseva e Jolesz, 2001; Kinoshita, McDannold, Jolesz e Hynynen,

2006). Os ultrassons formam-se quando a energia elétrica gerada é convertida pelo material piezoelétrico do transdutor em energia mecânica e ao concentrarem a energia produzida no local de aplicação atravessam o crânio e penetram no cérebro provocando uma ruptura local da BHE com alterações mínimas nos tecidos circundantes. Importa, no entanto, ter em consideração as barreiras tecnológicas deste método como o facto de existir a possibilidade de absorção de energia pelas estruturas ósseas, a variabilidade interindividual e a não homogeneidade do crânio, fatores que podem influenciar a qualidade do procedimento. O agente de contraste Optison<sup>TM</sup>, uma suspensão composta por microesferas de albumina cujo princípio ativo é o gás octafluoropropano, possui microbolhas com um diâmetro compreendido entre os 2 e os 8  $\mu\text{m}$  e é injetado na corrente sanguínea antes da exposição aos ultrassons. As bolhas de gás para além de manterem a ruptura provocada pelos ultrassons confinada na região onde foram aplicadas permitem ainda a utilização de quantidades significativamente menores de energia (Hynynen, 2008). Habitualmente, as frequências de ultrassons utilizadas na ruptura da BHE na prática clínica estão compreendidas entre os 0,2 e os 1,5 MHz e alguns dos parâmetros que podem influenciar a qualidade e extensão da ruptura incluem o tamanho e a dose administrada do agente de contraste e também a amplitude da pressão dos ultrassons, verificando-se em ambas as situações uma relação diretamente proporcional no que respeita à ruptura da BHE. O diâmetro dos vasos e a sua elasticidade podem também influenciar o mecanismo de ruptura e uma vez que a pressão requerida é maior para frequências mais elevadas é necessário proceder a ajustes e otimizar os parâmetros consoante cada caso (Vlachos, Tung e Konofagou, 2011).

Vários têm sido os mecanismos propostos para justificar a ruptura da BHE provocada pelos ultrassons, contudo o seu modo de ação é ainda pouco claro. Em 2001 foi demonstrado por Hynynen e seus colegas que, durante a sonicação, as microbolhas de gás se expandem e contraem ao ritmo da frequência dos ultrassons interagindo com as paredes dos capilares (Hynynen et al., 2001). Esta oscilação das bolhas do agente de contraste parece provocar *stress* nas paredes dos capilares resultando no estiramento dos vasos, levando assim à ruptura da BHE. A indução de hipertermia provocada pelos ultrassons da qual se tira vantagem na ablação de tumores, pode também contribuir para um aumento da biodisponibilidade de moléculas lipofílicas nos tecidos neuronais e para alterações na permeabilidade da BHE (Cho, Lin e Cobb, 2002; Ka-Yun, Cho, Henthorn e Tanguay,

2004). Destacam-se ainda o aumento do transporte transcelular e paracelular como possíveis mecanismos que estão na base da eficácia dos ultrassons (Tabela X).

**Tabela X** – Mecanismos celulares dos ultrassons (Burgess e Hynynen, 2013).

Transporte Transcelular	Transporte Paracelular	
Formação de canais citoplasmáticos Aumento da Pinocitose/Endocitose Deformação células endoteliais por oscilação das bolhas de gás/Formação de poros membranares Mecanismos de transporte ativo	Estiramento das <i>tight junctions</i>	
	Disrupção das ocludinas e claudinas	Reorganização das proteínas das <i>gap junctions</i> (conexinas)

A Ressonância Magnética é notoriamente o método imagiológico de eleição utilizado, quer para confirmar a disrupção da BHE, quer para visualizar e identificar a região do cérebro onde esta ocorreu. Constitui um método de excelência pois oferece um contraste suave dos tecidos moles permitindo visualizar as diversas estruturas cerebrais e monitorizar todo o processo em tempo real assim como determinar a duração da disrupção. No entanto o seu uso encontra-se aprovado apenas para técnicas ablativas e por isso um outro método de deteção da disrupção da BHE desenvolvido por Hynynen e sua equipa baseia-se em microscopia de fluorescência por absorção de dois fotões e representa uma alternativa à ressonância magnética com resultados igualmente satisfatórios (Hynynen et al., 2001). Quanto ao período de disrupção da BHE conseguido com esta técnica, segundo os resultados de vários estudos efetuados com moléculas marcadoras como o gadolínio, a função da BHE é recuperada entre 6 e 24h após o procedimento, ainda que as TJ fiquem funcionais após aproximadamente 12h (Mei et al., 2009; Shang, Wang, Liu, Zhang e Xue, 2011).

A primeira evidência de que os ultrassons podem aumentar a biodisponibilidade de fármacos a nível cerebral foi publicada em 2006 após resultados favoráveis obtidos em estudos realizados em ratos. O anticorpo monoclonal anti-HER2, Trastuzumab (Herceptin®), foi detetado em zonas cerebrais que foram alvo de sonicação enquanto nas regiões em que a BHE permaneceu intacta este fármaco não foi detetado ou atingiu concentrações inferiores ao limite de deteção (Kinoshita et al., 2006b; Kinoshita, McDannold, Jolesz e Hynynen, 2006a). A epirrubicina e a doxorubicina são exemplos

de outros fármacos antineoplásicos que apresentaram concentrações cerebrais significativas após a aplicação de ultrassons em animais, tendo-se verificado inclusive uma diminuição do crescimento de tumores cerebrais e um aumento do seu tempo de sobrevivência (Liu et al., 2010; Treat et al., 2012). Esta técnica aparenta ainda ter aplicabilidade na veiculação de células *natural killer* ao cérebro com o intuito de eliminar metástases cerebrais de cancro de mama, na veiculação de *stem cells* neuronais, em terapia génica utilizando vetores como os vírus adeno-associados e no tratamento da doença de Alzheimer (Choi et al., 2008; Burgess et al., 2011; Thévenot et al., 2011). Para os pacientes este método oferece inúmeros benefícios como o facto de não requerer intervenção cirúrgica com perfuração do crânio e sangramento associados e não necessitar de sedação, estando o doente acordado e consciente durante todo o processo. As principais vantagens residem no facto de ser um método não invasivo uma vez que os ultrassons são aplicados no crânio intacto, embora haja necessidade de perfusão contínua ou injeção repetida de agente de contraste pois as microbolhas que o constituem têm uma semivida de aproximadamente 2 minutos. É considerado um método seguro pois não existe evidência de alterações histológicas, isquemia, apoptose ou alterações comportamentais, embora possa haver extravasão mínima de componentes sanguíneos e albumina que se sabe serem neurotóxicos; é reversível, dado que segundo evidenciam os estudos, a BHE recupera as suas funções entre 6 a 24h após a realização do procedimento, e preciso uma vez que os ultrassons têm a capacidade de serem direccionados e ficarem confinados ao local de aplicação (Burgess e Hynynen, 2013).

Em resumo, a utilização de ultrassons em associação com a ressonância magnética guiada constitui um método bastante promissor e tem potencial para vir a ser aplicado numa vasta panóplia de doenças neurológicas como a doença de Parkinson, dor neuropática, depressão, transtorno obsessivo-compulsivo, epilepsia, tremores e tumores cerebrais. Com a inovação tecnológica e aprovação desta técnica no tratamento das patologias anteriormente referidas prevê-se que o tratamento com ultrassons irá ter um impacto tremendo na vida de milhares de pessoas em todo o mundo. Para além do seu potencial no tratamento de patologias que afetam milhares de pessoas por todo o globo esta técnica permite ainda, através na neuroestimulação, mapear e compreender melhor o funcionamento cerebral e a fisiopatologia de muitas doenças possibilitando assim o desenvolvimento de novos tratamentos, mais específicos e direccionados, e consequentemente, mais eficazes.

## **4.5 Vias de Administração Alternativas**

Ao contrário das estratégias anteriormente enumeradas, que se baseiam essencialmente na modificação de fatores que possam afetar o normal funcionamento da BHE e na manipulação de fármacos, ao recorrer-se a vias alternativas para a veiculação de fármacos ao cérebro estes são administrados para além da BHE. Este procedimento é denominado de *bypass* da BHE e consiste na administração do fármaco diretamente no SNC, como ocorre na administração IC, IVT e intratecal (IT). Nos últimos anos também a via intranasal (IN) tem sido alvo de vários estudos pois oferece inúmeras vantagens, nomeadamente o facto de não ser invasiva e de a administração de fármaco poder ser realizada pelo próprio doente (Privalova, Gulyaeva e Bukreeva, 2012). Quando se compara a administração IC, IVT ou IT com a administração intranasal de fármacos, a vantagem que mais se destaca em termos farmacocinéticos é a sua biodisponibilidade, pois ao administrar a dose diretamente no SNC consegue obter-se uma biodisponibilidade igual a 100%.

De seguida serão abordadas de forma breve as vias de administração alternativas acima enunciadas e ainda a administração de fármacos através do ouvido interno.

### **4.5.1 Via Intranasal**

A administração IN surge como uma opção atrativa para a veiculação cerebral de fármacos pois a sua aplicação estende-se a fármacos biológicos como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, células estaminais e vetores virais, refletindo este vasto leque de moléculas o seu enorme potencial terapêutico (Lochhead e Thorne, 2012).

A proximidade anatómica entre cérebro e a cavidade nasal e a conexão existente entre estas estruturas tornam apelativa esta via de administração. Contudo, o reduzido comprimento desta (aproximadamente 12 a 14 cm) e a sua diminuta área de superfície de absorção (160 cm<sup>2</sup>) são apontados como limitações deste método (Harkema, Carey e Wagner, 2006). Em contrapartida, a administração IN de fármacos quando comparada com a administração IC e IT oferece como principal vantagem o facto de ser um

procedimento não invasivo, logo desprovido de todos os riscos associados a estas vias (Illum, 2000).

Embora a cavidade nasal seja constituída por 4 tipos diferentes de epitélios, o epitélio respiratório que constitui 80-90% da mesma e o epitélio olfatório que constitui 10% desta, representam os principais locais de absorção de fármacos administrados via IN (Lochhead e Thorne, 2012). Um estudo efetuado em ratos e macacos realizado com recurso à administração IN de proteínas marcadas com um radioisótopo do iodo,  $I^{125}$ , revelou que o nervo olfativo e o nervo trigémeo representam as vias de transporte de maior relevância (Thorne, Pronk, Padmanabhan e Frey, 2004). Ainda que o mecanismo exato pelo qual o fármaco é absorvido através da mucosa nasal careça de estudos mais pormenorizados, sabe-se que o transporte de substâncias ao longo destes nervos pode ser executado quer por via intracelular quer por via extracelular. Nas vias intracelulares incluem-se a passagem de moléculas para o interior dos neurónios olfativos sensoriais através de endocitose, o transporte intraneuronal e ainda a absorção mediada por transcitose ao nível do bulbo olfativo (Thorne, Emory, Ala, e Frey, 1995). Por outro lado, o transporte por meio de vias extracelulares compreende a difusão paracelular e a captação do fármaco pelos neurónios. Uma vez concluída a passagem através da mucosa nasal, as possíveis vias de entrada no cérebro situam-se ao nível do bulbo olfativo e do tronco cerebral. Posteriormente, a distribuição do fármaco a áreas cerebrais específicas depende essencialmente das sinapses entre os neurónios periféricos e os neurónios de segunda ordem e células ganglionares do nervo trigémeo, e da difusão através dos espaços perivasculares existentes no parênquima cerebral.

A primeira barreira com que um fármaco administrado por via IN se depara é a camada de muco que reveste a cavidade nasal. A *clearance* mucociliar, que pode influenciar a absorção de fármaco, depende da eficácia e integridade das células ciliares, pelo que durante o desenvolvimento de novas formulações devem ser realizados testes para confirmar que os movimentos ciliares não são afetados ou inibidos e que a função destas células não é comprometida. Outros fatores fisiológicos e físico-químicos afetam também a absorção de fármacos através desta via. A constituição da cavidade nasal e a vascularização da mucosa nasal são fatores fisiológicos que podem influenciar a absorção de fármacos. Alguns estudos indicam que a adição de vasoconstritores às formulações para administração IN de fármacos promove a retenção destes na mucosa nasal e favorece a sua difusão para o SNC (Dhuria, Hanson, e Frey, 2010). A presença de sistemas

enzimáticos e transportadores de efluxo como a gpP levam à degradação e impedem a absorção de fármaco pelo que a administração concomitante de inibidores enzimáticos, ou a sua inclusão na formulação, constitui uma hipótese para contornar este problema. Características físico-químicas como a massa molecular e a lipofilia são fatores extremamente importantes tanto para a absorção ao nível da mucosa nasal como na penetração cerebral e podem ser otimizadas recorrendo ao uso de pró-fármacos, conforme discutido anteriormente, polímeros mucoadesivos e excipientes promotores de absorção.

Parâmetros de formulação como o pH, osmolaridade, viscosidade, forma farmacêutica e constituição da formulação devem também ser considerados quando se recorre a administração IN. Um aumento da viscosidade da formulação permite aumentar o tempo de contacto entre esta e a mucosa nasal melhorando a absorção de fármaco. No entanto, a viscosidade excessiva pode alterar o normal funcionamento dos cílios e a *clearance* de muco. A Tabela XI resume de um modo geral as vantagens e desvantagens associadas à administração IN de fármacos.

Para além das desvantagens apresentadas existe ainda a possibilidade de parte da formulação ser drenada para a faringe, acabando por ser posteriormente deglutida, não exercendo assim a dose administrada o efeito terapêutico desejado (Gizurarson, 1993). Os geles que, por serem formas farmacêuticas mais viscosas, têm sido utilizados para administração IN apresentam também a vantagem de minimizar a perda de formulação para a orofaringe (Chelladurai, Mishra e Mishra, 2008).

Fármacos utilizados em estudos de veiculação cerebral através da via IN incluem o inibidor da telomerase GRN 163, a carbegolina, o metotrexato, o sumatriptano, a insulina e a leptina (Hashizume et al., 2008; Privalova et al., 2012). Cerca de 15 minutos após administração IN do citostático metotrexato observou-se uma concentração no LCR três vezes mais elevada do que no sangue sendo que quando a coadministrado com o diurético acetazolamida, que limita a excreção de LCR e fármaco do plexo coroideu, verificou-se um aumento exponencial da sua concentração no SNC (Shingaki et al., 2010).

**Tabela XI** – Vantagens e desvantagens da administração intranasal de fármacos (Adaptado de Lochhead e Thorne, 2012).

Vantagens	Desvantagens
Método não-invasivo	Limitado a fármacos potentes e a pequenos volumes (25-200 µL)
Risco reduzido de infecção	Intensa atividade enzimática da mucosa nasal/Elevada <i>clearance</i> do fármaco
Rápida absorção/Rápido início de ação	pH ácido da mucosa nasal
Ajuste de dose possível	↓ Permeabilidade a moléculas hidrofílicas
Possibilidade de autoadministração	Variabilidade anatômica e fisiológica interindividual
Ausência de efeito de 1ª passagem	Patologias do trato respiratório/Irritação nasal
Epitélio nasal muito vascularizado	Reduzida área de superfície

Um estudo realizado em ratos demonstrou que a administração de doses iguais de interferon- $\beta$ 1b acoplado a I<sup>125</sup>, um fármaco utilizado no tratamento da esclerose múltipla, se traduz em níveis mais elevados no SNC quando administrado por via IN em comparação com a via intravenosa (Ross et al., 2004). Apesar das vantagens apresentadas e dos estudos em animais revelarem resultados animadores são necessários estudos em humanos que comprovem a eficácia desta abordagem. O sucesso da administração IN depende em grande parte do desenvolvimento de formulações adequadas que permitam obter concentrações terapêuticas no SNC. A funcionalização de nanopartículas e a utilização de geles e nanogeles representam uma possibilidade de êxito recorrendo a esta via de administração.

#### 4.5.2 Administração intratecal

A administração IT, também denominada de administração subaracnóideia caracteriza-se pela injeção ou infusão de substâncias diretamente no canal raquidiano, mais especificamente no espaço subaracnoide através de uma punção lombar, permitindo assim contornar o principal obstáculo na veiculação de fármacos ao SNC, a BHE. Apesar de ser considerada uma das vias mais nobres e delicadas e ser utilizada com pouca frequência devido aos riscos associados e ao desconforto para os doentes, apresenta-se como uma alternativa teoricamente viável para a administração de fármacos de grandes

dimensões como proteínas e péptidos (Wang, Siahaan e Soltero, 2005). Atualmente, é comum recorrer-se a esta via para administração local de analgésicos opióides e anestésicos na medida em que é possível reduzir em grande parte os efeitos adversos desta medicação a nível sistémico. Contudo, verifica-se que estes agentes são rapidamente removidos do LCR para a corrente sanguínea devido a serem moléculas lipofílicas de pequenas dimensões, ao invés das proteínas que segundo a evidência sugere têm uma *clearance* muito mais reduzida (Grabow, Derdzinski e Staats, 2001). Exemplos clínicos de outros fármacos administrados por esta via são os aminoglicosídeos utilizados no tratamento de meningites, o baclofeno usado no tratamento da espasticidade, e antineoplásicos no tratamento de metástases cerebrais ou tumores do SNC. Um estudo que consistiu na administração intratecal de leptina, uma hormona que inibe o apetite promovendo assim a perda de peso, suporta a utilização desta via na administração para substâncias de massa molecular elevada. Através da realização de uma tomografia por emissão de positrões a investigação demonstrou que 3h após a punção lombar a hormona conseguiu atingir o hipotálamo em concentrações superiores aquelas requeridas para se observar efeito terapêutico (McCarthy et al., 2002).

#### **4.5.3 Administração intraventricular e intracerebral**

Tal como o próprio nome sugere esta abordagem envolve a administração direta de fármacos no cérebro ou ventrículos laterais e por isso compreende uma perfuração, ou craniotomia, seguida da implantação de um cateter ou dispositivo de libertação prolongada de fármaco. Se por um lado esta estratégia permite minimizar os efeitos tóxicos dos fármacos a nível sistémico, pois o fármaco é diretamente administrado no seu local de ação, por outro lado, um inconveniente associado a estas duas vias de administração está relacionado com o facto de a distribuição de fármaco e o volume a administrar serem relativamente limitados. Calcula-se que o volume de administração que é possível ser aplicado por estas vias representa menos de 1% do volume cerebral sendo que praticamente nenhuma patologia é curável com doses tão reduzidas de fármaco (Pardridge, 2003). Enquanto na administração IC o fármaco se mantém praticamente confinado ao local de injeção, na administração IV o fármaco é rapidamente drenado e

transportado para a circulação periférica através do LCR exercendo um efeito mínimo no SNC (Yan et al., 1994; Krewson, Klarman e Saltzman, 1995).

Embora representem uma alternativa, pelo facto de serem técnicas extremamente invasivas e se caracterizarem por uma maior incidência de hemorragias e infeções do SNC, podendo culminar ainda num aumento da pressão intracraniana, são abordagens pouco interessantes do ponto de vista clínico. Ainda assim encontra-se disponível no mercado e é aplicado na prática clínica um dispositivo de reservatório implantável para administração IVT de fármacos, brevemente descrito de seguida.

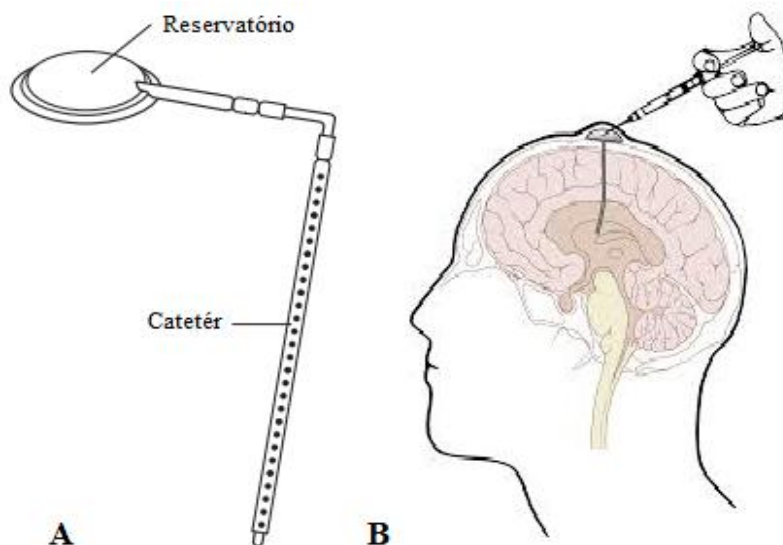
#### **4.5.4 Dispositivos de implantação cerebral**

Com o objetivo de manter concentrações terapêuticas de fármaco no local de ação foram desenvolvidos sistemas de libertação controlada e prolongada de fármaco destinados à implantação cerebral. *InfusAid® pump*, *MiniMed Programmable Implantable Infusion System (PIMS)* e *Medtronic SynchroMed II* são os nomes comerciais de três bombas, disponíveis nos EUA, destinadas à veiculação de fármacos ao SNC. Estes dispositivos atuam por diferentes mecanismos, que variam desde mecanismos peristálticos à utilização de pressão de vapor, sendo que a taxa de libertação de fármaco pode ser controlada por meios externos computadorizados (Misra et al., 2003). Mais recentemente foi desenvolvido um sistema bioartificial implantável, composto por um núcleo células secretoras envolvidas por uma membrana semipermeável e porosa que permite a nutrição, proteção e manutenção das mesmas no local da implantação assim como a libertação das moléculas de fármaco e metabolitos tóxicos produzidos para o exterior (Vyas e Khar, 2007). Na sequência desta abordagem será descrito de forma pormenorizada um sistema disponível em Portugal, semelhante aos anteriormente mencionados, o reservatório Ommaya.

#### **4.5.4.1 Reservatório Ommaya**

O reservatório Ommaya, um sistema com dupla funcionalidade que permite a administração IVT de fármacos e a drenagem de LCR, destinando-se por este motivo ao tratamento de hidrocefalias, recolha de amostras de LCR ou à administração de antineoplásicos e outros fármacos, foi desenvolvido em 1963 pelo neurocirurgião paquistanês Ayub Ommaya do qual recebeu o nome (Sundaresan e Suite, 1989). Tal como se pode visualizar na Figura 6A, este dispositivo é constituído por duas partes distintas: um pequeno recipiente de plástico que funciona como reservatório de fármaco onde este é injetado com o auxílio de uma seringa, e um tubo ou cateter que tem início no reservatório e cuja extremidade é introduzida diretamente num dos ventrículos cerebrais laterais. Embora seja um equipamento muito utilizado na área da oncologia, para administração de quimioterapia, este reservatório pode também ser colocado em doentes em estado terminal para administração paliativa de morfina e outros analgésicos opióides (Raney e Kirk, 1988; Sandberg, Bilsky, Souweidane, Bzdil e Gutin, 2000). No tratamento de meningites crónicas o reservatório Ommaya também é usado para administração repetida de antibióticos e antifúngicos (disponível em <http://www.manualmerck.net/?id=104&cn=933>).

Genericamente, o procedimento inicia-se com uma anestesia geral seguida da remoção de uma pequena quantidade de cabelo em redor da região onde é feita a incisão. Consecutivamente, é realizada uma perfuração do crânio com exposição da duramáter e através de uma ressonância magnética guiada o reservatório é inserido subcutaneamente no topo do crânio. Após finalizada a colocação do dispositivo procede-se à suturação do golpe anteriormente feito e o doente deve permanecer sob observação, pelo menos, nas 24h seguintes. A área da incisão deve ser mantida seca até à remoção dos pontos assim como o aspeto do local intervencionado deve ser monitorizado. É ainda necessário estar alerta para sinais de infeção como febre, rigidez do pescoço, vómitos, dores de cabeça, vermelhidão, sensibilidade e drenagem de líquido. De notar que a inserção do reservatório deve ser realizada por um cirurgião em ambiente hospitalar e em condições de assepsia. Uma vez colocado o dispositivo é possível administrar o fármaco com recurso a uma seringa sempre que haja necessidade (Figura 6B).



**Figura 6** – A: Representação esquemática do reservatório Ommaya (disponível em <http://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/resources/about-your-omaya-reservoir-placement-surgery>); B: Reservatório Ommaya implantado e administração de fármaco (disponível em [http://en.wikipedia.org/wiki/Ommaya\\_reservoir](http://en.wikipedia.org/wiki/Ommaya_reservoir)).

O medicamento Depocyte®, anteriormente mencionado, cujo princípio ativo é a citarabina formulada numa suspensão lipossomal, está autorizado em Portugal desde 2001. Tem indicação terapêutica no tratamento da meningite linfomatosa através de administração IT mas é utilizado a maioria das vezes em doentes paliativos através de um reservatório Ommaya (administração IVT) ou através de punção lombar (disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000317/WC500035649.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000317/WC500035649.pdf)).

#### 4.5.5 Administração de fármacos através do ouvido interno

Recentemente projetada como uma nova via de veiculação de fármacos ao cérebro devido à sua proximidade com este órgão, à semelhança da via intranasal, o ouvido interno abre novas perspectivas e representa uma alternativa para o tratamento de doenças neurológicas. Investigadores do *Tampere University Hospital*, na Finlândia, reportaram num estudo que data de 2003 a possibilidade de uma estrutura do ouvido interno derivar do LCR, despertando assim a atenção para a eventual comunicação existente entre o ouvido e o cérebro (Zou et al., 2003). Uma investigação recente veio reforçar esta teoria comprovando que após administração intratimpânica de uma formulação constituída por nanopartículas de um PLGA existe uma melhoria e aumento significativo da distribuição de vários agentes terapêuticos no LCR, ouvido interno e tecidos cerebrais quando em comparação com a administração intravenosa (Chen, Zhang, Yang e Mu, 2010).

Estudos preliminares toxicológicos não evidenciaram quaisquer danos ou alterações funcionais ao nível da cóclea após este procedimento e adicionalmente estudos farmacodinâmicos indicaram ainda que a formulação estudada possui um efeito protetor a nível cerebrovascular através da inibição de reações oxidativas catalisadas pelas enzimas superóxido dismutase e óxido nítrico sintetase (Zhang et al., 2013). Contudo são necessários mais estudos que assegurem a eficácia e segurança desta abordagem.

## **5. Conclusões e perspectivas futuras**

A veiculação cerebral de fármacos é particularmente desafiante dada a existência da BHE, o principal obstáculo à penetração de fármacos no SNC. No entanto, embora a BHE tenha um papel determinante na proteção do ambiente cerebral, esta não é uma estrutura estática, estando continuamente a sofrer transformações. Na presença de patologia e à medida que se envelhece esta estrutura biológica altamente dinâmica sofre mudanças que afetam a sua permeabilidade.

Em resultado do aumento da incidência das doenças neurológicas e mentais associadas ao envelhecimento da população, nos últimos anos a Indústria e a Comunidade Académica e Farmacêutica têm apostado no estudo e desenvolvimento de novas técnicas de veiculação de fármacos ao cérebro. As principais estratégias incluem a manipulação e modificação química de fármacos, a alteração transitória da permeabilidade da BHE e o recurso a vias de administração alternativas. Apesar do grande potencial de algumas abordagens como a administração IN de fármacos, a encapsulação de fármacos em lipossomas, nanopartículas e monócitos funcionalizados, e a aplicação de ultrassons, não existe contudo, um método universal e ideal no sentido de ser aplicável a todas as patologias e tipos de fármacos utilizados no tratamento destas doenças. Nenhum método é 100% eficaz pois todos apresentam vantagens e desvantagens que devem ser analisadas em função do fármaco em questão, da patologia a tratar e da situação clínica do doente, sendo ainda imperativo realizar uma avaliação da relação risco-benefício da sua implementação, caso a caso.

Face ao exposto anteriormente, é necessário frisar que estes métodos desenvolvidos para a veiculação cerebral de fármacos se destinam a ser utilizados em situações patológicas e não em indivíduos saudáveis. Assim, dado que grande parte dos estudos são realizados em culturas de células ou em animais saudáveis, os dados provenientes destes ensaios devem ser interpretados e extrapolados cuidadosamente de modo a evitar conclusões erradas, concluindo-se por isso que é fundamental que, de futuro, se utilizem modelos padronizados de animais doentes de modo permitir a comparação entre diferentes estudos e obtenção de resultados mais fidedignos.

Em termos de perspectivas futuras, várias são as abordagens que se têm vindo a revelar promissoras. A utilização de vírus não patogénicos, como vírus adeno associados, como sistemas de transporte e vetorização cerebral foi avançada como uma possível via para veicular fármacos ao interior das células uma vez que estes microrganismos são parasitas intracelulares obrigatórios. A implantação cerebral de células e tecidos manipulados geneticamente para produzir determinados fármacos e o desenvolvimento de novos dispositivos de implantação cerebral constituem também alternativas que irão permitir teoricamente um melhor controlo dos sintomas em doenças como por exemplo a epilepsia, eliminando problemas relacionados com a adesão dos doentes às terapêuticas instituídas. Todavia, continuam ainda por explorar outras possíveis vias de penetração de fármacos no cérebro como os OCV que, por não expressarem a BHE clássica e serem bastante vascularizados, são mais permeáveis a substâncias exógenas, assim como recetores e transportadores específicos expressos na BHE.

A necessidade de pesquisa de marcadores específicos de doença está também patente, na medida em que irá possibilitar um tratamento personalizado das diferentes patologias minimizando-se os efeitos adversos de alguns fármacos, em especial daqueles que são muito potentes e tóxicos.

As nanopartículas, apesar de serem bastante versáteis e representarem uma das estratégias com maior aplicabilidade e probabilidade de sucesso, carecem de estudos sobre a sua farmacocinética, danos em estruturas celulares e interação com o hospedeiro em termos de biodistribuição, degradação e acumulação.

Para maximizar as probabilidades de sucesso e eficácia clínica propõe-se a combinação duas ou mais estratégias em simultâneo, como por exemplo a veiculação de fármacos através de transportadores coloidais de partículas funcionalizados em associação com aplicação de ultrassons. Acima de tudo, pretende-se que, com o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos ao cérebro, se criem dispositivos de libertação prolongada de fármacos, custo-efetivos, seguros, não invasivos e de fácil administração que permitam manter o controlo dos sintomas.

Apesar do avanço científico, o conhecimento acerca do funcionamento cerebral e da fisiopatologia das doenças que afetam o SNC é muito reduzido, o que cria barreiras ao desenvolvimento de sistemas de veiculação cerebral de fármacos adequados e eficazes.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abbott, N. J. (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20(2), 131–147.
- Abbott, N. J. (2004). Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drugs Discovery Today: Technologies*, 1, 407–416. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.014.
- Abbott, N. J., e Friedman, A. (2012). Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia*, 53(6), 1–6. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., e Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., e Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. doi:10.1038/nrn1824
- Adamson, R. H., Lenz, J. F., Zhang, X., Adamson, G. N., Weinbaum, S., e Curry, F. E. (2004). Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *The Journal of Physiology*, 557, 889–907. doi:10.1113/jphysiol.2003.058255
- Afergan, E., Epstein, H., Dahan, R., Koroukhov, N., Rohekar, K., Danenberg, H. D., e Golomb, G. (2008). Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes. *Journal of Controlled Release*, 132, 84–90. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.017
- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., e McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 428–437. doi:10.1016/j.addr.2009.03.009
- Anderberg, E. K., Lindmark, T., e Artursson, P. (1993). Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharmaceutical Research*, 10(6), 857–864. doi:10.1023/A:1018909210879
- Anderson, B. D. (1996). Prodrugs for improved CNS delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19(2), 171–202. doi:10.1016/0169-409X(95)00106-H
- Annunziata, P., Cioni, C., Toneatto, S., e Paccagnini, E. (1998). HIV-1 gp120 increases the permeability of rat brain endothelium cultures by a mechanism involving substance P. *AIDS (London, England)*, 12(18), 2377–2385. doi:10.1097/00002030-199818000-00006

- Azeredo, F. J., Uchôa, F., Costa, T. D. (2009). P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. *Brazilian Journal of Pharmacy*, 90(4), 321–326.
- Baker, M. (2013). Year of the Brain in Europe 2014 – a new impulse to strengthen the alliance for brain health. *Croatian Medical Journal*, 54(5), 417–418. doi:10.3325/cmj.2013.54.417
- Ballabh, P., Braun, A., e Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1–13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Ballantine, H. T., Bell, H., Manlapaz, J. (1960). Progress and Problems in the Neurological Applications of Focused Ultrasound. *Journal of Neurology*, 17(5), 858–876. doi:10.1016/j.survophthal.2007.08.005
- Batista, C. M., Moraes, C., Carvalho, B. De, e Santos, N. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), 167–179.
- Begley, D. J., Pontikis, C. C., e Scarpa, M. (2008). Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 14(16), 1566–1580. doi:10.2174/138161208784705504
- Bellavance, M.-A., Blanchette, M., e Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *The AAPS Journal*, 10(1), 166–177. doi:10.1208/s12248-008-9018-7
- Bhaskar, S., Tian, F., Stoeger, T., Kreyling, W., de la Fuente, J. M., Grazú, V., ... Razansky, D. (2010). Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(3), 1–55. doi:10.1186/1743-8977-7-3
- Bidanset, D. J., Placidi, L., Rybak, R., Palmer, J., Sommadossi, J. P., e Kern, E. R. (2001). Intravenous infusion of cereport increases uptake and efficacy of acyclovir in herpes simplex virus-infected rat brains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2316–2323. doi:10.1128/AAC.45.8.2316-2323.2001
- Black, K. L., e Chio, C. C. (1992). Increased opening of blood-tumour barrier by leukotriene C4 is dependent on size of molecules. *Neurological Research*, 14(5), 402–404.
- Boado, R. J., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., e Pardridge, W. M. (2008). GDNF fusion protein for targeted-drug delivery across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2), 387–396. doi:10.1002/bit.21764
- Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H.-H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., ... Nies, A. T. (2005). ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Research*, 65(24), 11419–11428. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1271

- Burgess, A., Ayala-Grosso, C. A., Ganguly, M., Jordão, J. F., Aubert, I., e Hynynen, K. (2011). Targeted delivery of neural stem cells to the brain using MRI-guided focused ultrasound to disrupt the blood-brain barrier. *PLoS ONE*, 6(11), e27877. doi:10.1371/journal.pone.0027877
- Burgess, A., e Hynynen, K. (2013). Noninvasive and targeted drug delivery to the brain using focused ultrasound. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(4), 519–526. doi:10.1021/cn300191b
- Butt, A. M., Jones, H. C., e Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of Physiology*, 429, 47–62.
- Carafa, M., Marianecchi, C., Di Marzio, L., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L. I., e Santucci, E. (2010). Potential dopamine prodrug-loaded liposomes: preparation, characterization, and in vitro stability studies. *Journal of Liposome Research*, 20(3), 250–257. doi:10.3109/08982100903384129
- Cardoso, F. L., Brites, D., Brito, M. A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*, 64(2), 328–363. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.05.003.
- Chen, G., Zhang, X., Yang, F., e Mu, L. (2010). Disposition of nanoparticle-based delivery system via inner ear administration. *Current Drug Metabolism*, 11(10), 886–897. doi:10.2174/138920010794479673
- Chen, Y., e Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 640–665. doi:10.1016/j.addr.2011.11.010
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., e Walz, T. (2004). Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 116(4), 565–576. doi:10.1016/S0092-8674(04)00130-8
- Chin, C., Kim, I. K., Lim, D. Y., Kim, K. S., Lee, H. A., e Kim, E. J. (2010). Gold nanoparticle-choline complexes can block nicotinic acetylcholine receptors. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 315–321.
- Chio, C. C., Baba, T., e Black, K. L. (1992). Selective blood-tumor barrier disruption by leukotrienes. *Journal of Neurosurgery*, 77(3), 407–410. doi:10.3171/jns.1992.77.3.0407
- Cho, C. W., Liu, Y., Cobb, W. N., Henthorn, T. K., Lillehei, K., Christians, U., e Ng, K. Y. (2002). Ultrasound-induced mild hyperthermia as a novel approach to increase drug uptake in brain microvessel endothelial cells. *Pharmaceutical Research*, 19(8), 1123–1129. doi:10.1023/A:1019837923906
- Choi, J. J., Wang, S., Brown, T. R., Small, S. A., Duff, K. E. K., e Konofagou, E. E. (2008). Noninvasive and transient blood-brain barrier opening in the hippocampus

- of Alzheimer's double transgenic mice using focused ultrasound. *Ultrasonic Imaging*, 30(3), 189–200. doi:0161-7346/08
- Chopra, D., Gulati, M., Saluja, V., Pathak, P., e Bansal, P. (2008). Brain permeable nanoparticles. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3(3), 216–225. doi:10.2174/157488908786242461
- Cisternino, S., Rousselle, C., Dagenais, C., e Scherrmann, J. M. (2001). Screening of multidrug-resistance sensitive drugs by in situ brain perfusion in P-glycoprotein-deficient mice. *Pharmaceutical Research*, 18(2), 183–190. doi:10.1023/A:1011080418027
- Clark, D. E. (2003). In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug Discovery Today*, 8(20), 927–933.
- Cokic, V. P., Beleslin-Cokic, B. B., Tomic, M., Stojilkovic, S. S., Noguchi, C. T., e Schechter, A. N. (2006). Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. *Blood*, 108(1), 184–191. doi:10.1182/blood-2005-11-4454
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R., e Bertino, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(2), 695–698. doi:10.1073/pnas.86.2.695
- Correale, J., e Villa, A. (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, 40(2), 148–160. doi:10.1080/08916930601183522
- Deamer, D. W. (2010). From “banghasomes” to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), 1308–1310. doi:10.1096/fj.10-0503
- Deeken, J. F., e Löscher, W. (2007). The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1663–1674. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2854
- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G., e Cecchelli, R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *The Journal of Cell Biology*, 138(4), 877–889. doi:10.1083/jcb.138.4.877
- Deli, M. A. (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4), 892–910. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.016
- Dell'Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T., e Linse, S. (2010). Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS ONE*, 5(6), e10949. doi:10.1371/journal.pone.0010949

- Demeule, M., Currie, J. C., Bertrand, Y., Ché, C., Nguyen, T., Régina, A., ... Béliveau, R. (2008). Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector Angiopep-2. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1534–1544. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05492.x
- Demeule, M., Poirier, J., Jodoin, J., Bertrand, Y., Desrosiers, R. R., Dagenais, C., ... Béliveau, R. (2002). High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, 83, 924–933. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01201.x
- Demeule, M., Re, A., Che, C., Poirier, J., Nguyen, T., Gabathuler, R., ... Be, R. (2008). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1064–1072. doi:10.1124/jpet.107.131318.Parkinson
- Demeule, M., Shedid, D., Beaulieu, É., Del Maestro, R. F., Moghrabi, A., Ghosn, P. B., ... Béliveau, R. (2001). Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *International Journal of Cancer*, 93(1), 62–66. doi:10.1002/ijc.1306
- Desai, B. S., Monahan, A. J., Carvey, P. M., e Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplantation*, 16(3), 285–299.
- Dhanikula, A. B., e Panchagnula, R. (2005). Preparation and characterization of water-soluble prodrug, liposomes and micelles of Paclitaxel. *Current Drug Delivery*, 2(1), 75–91. doi:10.2174/1567201052772861
- Dhuria, S. V., Hanson, L. R., e Frey, W. H. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(4), 1654–1673. doi:10.1002/jps.21924
- Doolittle, N. D., Miner, M. E., Hall, W. A., Siegal, T., Jerome, E., Osztie, E., ... Neuwelt, E. A. (2000). Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer*, 88(3), 637–647. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88:3<637::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Y [pii]
- Emerich, D. F., Snodgrass, P., Pink, M., Bloom, F., e Bartus, R. T. (1998). Central analgesic actions of loperamide following transient permeation of the blood brain barrier with Cereport(TM) (RMP-7). *Brain Research*, 801, 259–266. doi:10.1016/S0006-8993(98)00571-X
- Erdlenbruch, B., Alipour, M., Fricker, G., Miller, D. S., Kugler, W., Eibl, H., e Lakomek, M. (2003). Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *British Journal of Pharmacology*, 140(7), 1201–1210. doi:10.1038/sj.bjp.0705554

- Fardel, O., Lecureur, V., e Guillouzo, A. (1996). The P-glycoprotein multidrug transporter. *General Pharmacology*, 27(8), 1283–1291. doi:10.1016/S0306-3623(96)00081-X
- Fellner, S., Bauer, B., Miller, D. S., Schaffrik, M., Fankhänel, M., Spruß, T., ... Fricker, G. (2002). Transport of paclitaxel ( Taxol ) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo, 110(9), 1309–1318. doi:10.1172/JCI200215451.Introduction
- Fernández, C., Nieto, O., Fontenla, J. A., Rivas, E., de Ceballos, M. L., e Fernández-Mayoralas, A. (2003). Synthesis of glycosyl derivatives as dopamine prodrugs: interaction with glucose carrier GLUT-1. *Organic e Biomolecular Chemistry*, 1(5), 767–771. doi:10.1039/b212066f
- Feun, L., Savaraj, N., Lu, K., Fields, W., Sutton, C. H., Too, T. (1984). Disruption of the blood brain barrier (BBB) with intracarotid hydroxyurea. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 25, 364.
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.-G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., ... Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 105(4-5), 423–438. doi:10.1007/s007020050068
- Gabathuler, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 48–57. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.028
- Gaillard, P. J., Brink, A., e de Boer, A. G. (2005). Diphtheria toxin receptor-targeted brain drug delivery. *International Congress Series*, 1277, 185–198. doi:10.1016/j.ics.2005.02.022
- Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., e Couvreur, P. (2005). Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *International Journal of Pharmaceutics*, 298(2), 274–292. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.031
- Gizurarson, S. (1993). The relevance of nasal physiology to the design of drug absorption studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(3), 329–347. doi:10.1016/0169-409X(93)90015-V
- González-Mariscal, L., Tapia, R., e Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 729–756. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.018
- Grabow, T. S., Derdzinski, D., e Staats, P. S. (2001). Spinal drug delivery. *Current Pain and Headache Reports*, 5(6), 510–516. doi:10.1097/00000542-200010000-00063
- Guillaume, D. J., Doolittle, N. D., Gahramanov, S., Hedrick, N. A., Delashaw, J. B., e Neuwelt, E. A. (2010). Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: Results of a phase I study. *Neurosurgery*, 66(1), 48–58. doi:10.1227/01.NEU.0000363152.37594.F7

- Gujral, S., Khatri, S. (2013). A Review on Basic Concept of Drug Targeting and Drug Carrier System, 2(1), 130–136.
- Gutman, M., Laufer, R., Eisenthal, A., Goldman, G., Ravid, A., Inbar, M., e Klausner, J. M. (1996). Increased microvascular permeability induced by prolonged interleukin-2 administration is attenuated by the oxygen-free-radical scavenger dimethylthiourea. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 43(4), 240–244. doi:10.1007/s002620050328
- Halmos, T., Santarromana, M., Antonakis, K., e Scherman, D. (1996). Synthesis of glucose-chlorambucil derivatives and their recognition by the human GLUT1 glucose transporter. *European Journal of Pharmacology*, 318(2-3), 477–484. doi:10.1016/S0014-2999(96)00796-0
- Harkema, J. R., Carey, S. A., e Wagner, J. G. (2006). The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic Pathology*, 34(3), 252–269. doi:10.1080/01926230600713475
- Herz, J., Strickland, D. K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 779–784.
- Hornykiewicz, O. (2010). A brief history of levodopa. *Journal of Neurology*, 257(2), 249–252. doi:10.1007/s00415-010-5741-y
- Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 49–53. doi:10.1016/j.coi.2005.11.008
- Hynynen, K. (2008). Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10), 1209–1217. doi:10.1016/j.addr.2008.03.010
- Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N., e Jolesz, F. A. (2001). Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology*, 220(3), 640–646. doi:10.1148/radiol.2202001804
- Iannitti, T., e Palmieri, B. (2010). An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Marine Drugs*, 8(8), 2267–2300. doi:10.3390/md8082267
- Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 1–18. doi:10.1016/S0928-0987(00)00087-7
- Inamura, T., e Black, K. L. (1994). Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(5), 862–870. doi:10.1038/jcbfm.1994.108
- Jones, A. R., e Shusta, E. V. (2007). Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharmaceutical Research*, 24(9), 1759–1771. doi:10.1007/s11095-007-9379-0

- Jouyban, A., e Soltani, S. (2012). Blood Brain Barrier Permeation. In *Toxicity and Drug Testing* (Prof. Bill., pp. 3–24). In Tech. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/toxicity-and-drug-testing/blood-brain-barrier-penetration>
- Juillerat-Jeanneret, L. (2008). The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discovery Today*, 13(23-24), 1099–1106. doi:10.1016/j.drudis.2008.09.005
- Juliano, R. L., e Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455(1), 152–162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7
- Kaefer, M., Vemulapalli, S., e Freeman, M. R. (2000). A nontoxic diphtheria toxin analogue inhibits neonatal bladder smooth muscle cell proliferation. *The Journal of Urology*, 163(2), 580–584. doi:10.1097/00005392-200002000-00051
- Kaminskas, L. M., Mcleod, V. M., Porter, H., Christopher, J., e Boyd, B. J. (2011). Differences in colloidal structure of PEGylated nanomaterials dictate the likelihood of accelerated blood clearance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 5069–5077. doi:10.1002/jps.22682
- Kannan, P., Telu, S., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Pike, V. W., Halldin, C., ... Hall, M. D. (2011). The “specific” P-glycoprotein inhibitor tariquidar is also a substrate and an inhibitor for Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *ACS Chemical Neuroscience*, 2(2), 82–89. doi:10.1021/cn100078a
- Karkan, D., Pfeifer, C., Vitalis, T. Z., Arthur, G., Ujii, M., Chen, Q., ... Jefferies, W. A. (2008). A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier. *PLoS ONE*, 3(7), 1–36. doi:10.1371/journal.pone.0002469
- Kaur, C., e Ling, E. A. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current Neurovascular Research*, 5(1), 71–81. doi:10.2174/156720208783565645
- Ke, W., Shao, K., Huang, R., Han, L., Liu, Y., Li, J., ... Jiang, C. (2009). Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials*, 30(36), 6976–6985. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.049
- Kelly, C., Jefferies, C., e Cryan, S.-A. (2011). Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *Journal of Drug Delivery*, 2011(2011), 1–11. doi:10.1155/2011/727241
- Kemper, E. M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, J. H., e van Tellingen, O. (2004). Modulation of the blood-brain barrier in oncology: Therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treatment Reviews*, 30(5), 415–423. doi:10.1016/j.ctrv.2004.04.001
- Khan, D. R. (2010). The use of Nanocarriers for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Journal of Cancer Science e Therapy*, 02, 58–62. doi:10.4172/1948-5956.1000024

- Killian, D. M., Gharat, L., e Chikhale, P. J. (2000). Modulating blood-brain barrier interactions of amino acid-based anticancer agents. *Drug Delivery*, 7(1), 21–25.
- Kinoshita, M., McDannold, N., Jolesz, F. A., e Hynynen, K. (2006a). Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 11719–11723. doi:10.1073/pnas.0604318103
- Kinoshita, M., McDannold, N., Jolesz, F. A., e Hynynen, K. (2006b). Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), 1085–1090. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.112
- Kovács, R., Heinemann, U., e Steinhäuser, C. (2012). Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia. *Epilepsia*, 53(6), 53–59. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03703.x
- Kozler, P., Riljak, V., e Pokorný, J. (2013). Both water intoxication and osmotic BBB disruption increase brain water content in rats. *Physiological Research*, 62(1), 75–80.
- Krewson, C. E., Klarman, M. L., e Saltzman, W. M. (1995). Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Research*, 680(1-2), 196–206. doi:10.1016/0006-8993(95)00261-N
- Krizbai, I. A., e Deli, M. A. (2003). Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cellular Molecular Biology*, 49(1), 23–31.
- Krol, S. (2012). Challenges in drug delivery to the brain: nature is against us. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 164(2), 145–155. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.044
- Kroll, R. A., e Neuwelt, E. A. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, 42(5), 1083–1100.
- Kumar, S., Gupta, S., e Sharma, P. (2012). Recent developments in targeted drug delivery system for crossing blood-brain barrier: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 36–41.
- Laine, K., e Gynther, M. (2008). Enhanced brain drug delivery and targeting. *Pharmaceutical Technology Europe*, 33–36.
- Laverman, P., e Boerman, O. (1999). Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 37(1-3), 225–235. doi:10.1016/S0169-409X(98)00095-7
- Lebson, L. A. (2008). *Monocytes as gene therapy vectors for the treatment of Alzheimer's disease. ProQuest Dissertations and Theses.*

- Lee, D., Walsh, J. D., Migliorini, M., Yu, P., Cai, T., Schwieters, C. D., ... Wang, Y.-X. (2007). The structure of receptor-associated protein (RAP). *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 16(8), 1628–1640. doi:10.1110/ps.072865407
- Lee, H. J., Engelhardt, B., Lesley, J., Bickel, U., e Pardridge, W. M. (2000). Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(3), 1048–1052.
- Leppänen, J., Huuskonen, J., Nevalainen, T., Gynther, J., Taipale, H., Järvinen, T. (2002). Design and synthesis of a novel L-dopa-entacapone codrug. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(6), 1379–1382.
- Leveugle, B., Spik, G., Perl, D. P., Bouras, C., Fillit, H. M., e Hof, P. R. (1994). The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Research*, 650(1), 20–31. doi:10.1016/0006-8993(94)90202-X
- Lin, H., Gebhardt, M., Bian, S., Kwon, K. A., Shim, C. K., Chung, S. J., e Kim, D. D. (2007). Enhancing effect of surfactants on fexofenadine.HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer. *International Journal of Pharmaceutics*, 330(1-2), 23–31. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.08.043
- Lipinski, C. A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 235–249. doi:10.1016/S1056-8719(00)00107-6
- Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Chu, P.-C., Wu, J.-S., ... Wei, K.-C. (2010). Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15205–15210. doi:10.1073/pnas.1003388107
- Lochhead, J. J., e Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 614–628. doi:10.1016/j.addr.2011.11.002
- MacDonell, L. A., Potter, P. E., e Leslie, R. A. (1978). Localized changes in blood-brain barrier permeability following the administration of antineoplastic drugs. *Cancer Research*, 38(9), 2930–2934.
- Mackey, J. R., Yao, S. Y., Smith, K. M., Karpinski, E., Baldwin, S. A., Cass, C. E., e Young, J. D. (1999). Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(21), 1876–1881.
- Madrid, Y., Langer, L.F., Brem, H., Langer, R. (1991). New directions in the delivery of drugs and other substances to the central nervous system. *Advances in Pharmacology*, 22, 299–324. doi:10.1371/journal.pmed.0020124

- Malm, T., Koistinaho, M., Muona, A., Magga, J., e Koistinaho, J. (2010). The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *GLIA*, 58(8), 889–900. doi:10.1002/glia.20973
- Manninger, S. P., Muldoon, L. L., Nesbit, G., Murillo, T., Jacobs, P. M., e Neuwelt, E. A. (2005). An exploratory study of ferumoxtran-10 nanoparticles as a blood-brain barrier imaging agent targeting phagocytic cells in CNS inflammatory lesions. *American Journal of Neuroradiology*, 26(9), 2290–2300. doi:26/9/2290 [pii]
- Martin, J., Maris, A., Ehtesham, M., e Singer, R. (2012). Rat model of blood-brain barrier disruption to allow targeted neurovascular therapeutics. *Journal of Visualized Experiments*, 69, e50019. doi:doi: 10.3791/50019.
- Masserini, M. (2013). Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1–18. doi:10.1155/2013/238428
- Matter, K., e Balda, M. S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods*, 30(3), 228–234. doi:10.1016/S1046-2023(03)00029-X
- McCarthy, T. J., Banks, W. A., Farrell, C. L., Adamu, S., Derdeyn, C. P., Snyder, A. Z., ... Welch, M. J. (2002). Positron emission tomography shows that intrathecal leptin reaches the hypothalamus in baboons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 878–883.
- McDannold, N., Vykhodtseva, N., e Hynynen, K. (2008). Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Focused Ultrasound and Circulating Preformed Microbubbles Appears to Be Characterized by the Mechanical Index. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(5), 834–840. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.10.016
- Mei, J., Cheng, Y., Song, Y., Yang, Y., Wang, F., Liu, Y., e Wang, Z. (2009). Experimental study on targeted methotrexate delivery to the rabbit brain via magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound. *Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 28(7), 871–880.
- Minderman, H., O'Loughlin, K. L., Pendyala, L., e Baer, M. R. (2004). VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(5), 1826–1834. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0914-3
- Mishima, K., Higashiyama, S., Nagashima, Y., Miyagi, Y., Tamura, A., Kawahara, N., ... Kirino, T. (1996). Regional distribution of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA and protein in adult rat forebrain. *Neuroscience Letters*, 213(3), 153–156.
- Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., e Shah, S. P. (2003). Drug delivery to the central nervous system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société*

*Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 6(2), 252–73. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935438>

- Mohanachandran, P. S., Sindhumol, P. G., Kiran, T. S., Arun, J. L., Saju, F., Mathew, J. K., e Vijayan, R. P. (2012). Recent trends in brain targeted drug delivery systems: an overview. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, 03(10), 1–9.
- Muzykantov, V. R. (2010). Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(4), 403–427. doi:10.1517/17425241003610633
- Namikawa, K., Asakura, M., Minami, T., Okazaki, Y., Kadota, E., e Hashimoto, S. (2000). Toxicity of cisplatin to the central nervous system of male rabbits. *Biological Trace Element Research*, 74(3), 223–235. doi:10.1385/BTER:74:3:223
- Negri, L., Lattanzi, R., Tabacco, F., Scolaro, B., e Rocchi, R. (1998). Glycodermorphins: opioid peptides with potent and prolonged analgesic activity and enhanced blood-brain barrier penetration. *British Journal of Pharmacology*, 124(7), 1516–1522. doi:10.1038/sj.bjp.0701971
- Neuwelt, E. A. (1989). *Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation*. (Plenum, Ed.) (Vol. 3, pp. 1–434). New York.
- Neuwelt, E. A., Barnett, P., Barranger, J., McCormick, C., Pagel, M., e Frenkel, E. (1983). Inability of dimethyl sulfoxide and 5-fluorouracil to open the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, 12(1), 29–34. doi:10.1227/00006123-198301000-00006
- Neuwelt, E. A., Glasberg, M., Frenkel, E., e Barnett, P. (1983). Neurotoxicity of chemotherapeutic agents after blood-brain barrier modification: neuropathological studies. *Annals of Neurology*, 14(3), 316–324.
- Neuwelt, E. A., Várallyay, P., Bagó, A. G., Muldoon, L. L., Nesbit, G., e Nixon, R. (2004). Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(5), 456–471. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00557.x
- Neuwelt, E.A.; Dahlborg, S. A. (1989). Blood-brain barrier disruption in the treatment of brain tumors: clinical implications. In P. Press (Ed.), *Implications of the Blood Brain Barrier and its Manipulation: Clinical Aspects* (pp. 195–262). New York.
- Ng, K. Y., Cho, C. W., Henthorn, T. K., e Tanguay, R. L. (2004). Effect of Heat Preconditioning on the Uptake and Permeability of R123 in Brain Microvessel Endothelial Cells during Mild Heat Treatment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4), 896–907. doi:10.1002/jps.20015
- Notman, R., Noro, M. G., e Anwar, J. (2007). Interaction of oleic acid with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers simulated by molecular dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(44), 12748–12755. doi:10.1021/jp0723564

- Oldendorf, W. H., Hyman, S., Braun, L., e Oldendorf, S. Z. (1972). Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science*, 178(4064), 984–986. doi:10.1126/science.178.4064.984
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.-U., e Jönsson, B. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 19(1), 155–162. doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03590.x
- Olesen, J., Leonardi, M. (2003). The burden of brain diseases in Europe. *European Journal of Neurology* :, 10(5), 471–477.
- Owens, D. E., e Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93–102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Pajouhesh, H., e Lenz, G. R. (2005). Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(4), 541–553. doi:10.1602/neurorx.2.4.541
- Pan, W., Kastin, A. J., Gera, L., e Stewart, J. M. (2001). Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. *Neuroscience Letters*, 307(1), 25–28. doi:10.1016/S0304-3940(01)01904-8
- Pardridge, W. M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions*, 3(2), 90–105. doi:10.1124/mi.3.2.90
- Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(1), 3–14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- Pardridge, W. M. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today*, 12(1-2), 54–61. doi:10.1016/j.drudis.2006.10.013
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), 1959–1972. doi:10.1038/jcbfm.2012.126
- Pardridge, W. M., Boado, R. J., Black, K. L., e Cancilla, P. A. (1992). Blood-brain barrier and new approaches to brain drug delivery. *The Western Journal of Medicine*, 156(3), 281–286.
- Parodi, A., Quattrocchi, N., van de Ven, A. L., Chiappini, C., Evangelopoulos, M., Martinez, J. O., ... Tasciotti, E. (2013). Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nature Nanotechnology*, 8, 61–68. doi:10.1038/nnano.2012.212
- Petkar, K. C., Chavhan, S. S., Agatonovik-Kustrin, S., e Sawant, K. K. (2011). Nanostructured materials in drug and gene delivery: a review of the state of the art.

- Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 28(2), 101–164. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v28.i2.10
- Pilizota, T., e Shaevitz, J. W. (2013). Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli*. *Biophysical Journal*, 104(12), 2733–2742. doi:10.1016/j.bpj.2013.05.011
- Potschka, H. (2010). Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches. *Pharmacogenomics*, 11(10), 1427–1438. doi:10.2217/pgs.10.126
- Privalova, A. M., Gulyaeva, N. V., e Bukreeva, T. V. (2012). Intranasal administration: a prospective drug delivery route to the brain. *Neurochemical Journal*, 6(2), 77–88. doi:10.1134/S1819712412020080
- Raney, J. P., e Kirk, E. A. (1988). The use of an Ommaya reservoir for administration of morphine sulphate to control pain in select cancer patients. *The Journal of Neuroscience Nursing: Journal of the American Association of Neuroscience Nurses*, 20(1), 23–29. doi:10.1097/01376517-198802000-00004
- Rapoport, S. I. (2000). Osmotic opening of the blood-brain barrier: Principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20(2), 217–230. doi:10.1023/A:1007049806660
- Rapoport, S. I., Hori, M., Klatzo, I. (1972). Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *American Journal of Physiology*, 223(2), 323–331. doi:10.1002/adma.200400767
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., e Savolainen, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(3), 255–270. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2468>
- Rautio, J., Laine, K., Gynther, M., e Savolainen, J. (2008). Prodrug approaches for CNS delivery. *The AAPS Journal*, 10(1), 92–102. doi:10.1208/s12248-008-9009-8
- Remsen, L. G., Pagel, M. A., McCormick, C. I., Fiamengo, S. A., Sexton, G., e Neuwelt, E. A. (1999). The influence of anesthetic choice, PaCO<sub>2</sub>, and other factors on osmotic blood-brain barrier disruption in rats with brain tumor xenografts. *Anesthesia and Analgesia*, 88(3), 559–567. doi:10.1213/00000539-199903000-00018
- Rip, J., Schenk, G. J., e de Boer, A. G. (2009). Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(3), 227–237. doi:10.1517/17425240902806383
- Rosenberg, G. A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1139–1151. doi:10.1038/jcbfm.2011.197

- Ross, T. M., Martinez, P. M., Renner, J. C., Thorne, R. G., Hanson, L. R., e Frey, W. H. (2004). Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: A non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 151(1-2), 66–77. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.02.011
- Sandberg, D. I., Bilsky, M. H., Souweidane, M. M., Bzdil, J., e Gutin, P. H. (2000). Ommaya reservoirs for the treatment of leptomeningeal metastases. *Neurosurgery*, 47(1), 49–55. doi:10.1227/00006123-200007000-00011
- Sapra, P., e Allen, T. M. (2003). Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*, 42(5), 439–462. doi:10.1016/S0163-7827(03)00032-8
- Saunders, N. R., Knott, G. W., e Dziegielewska, K. M. (2000). Barriers in the immature brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20(1), 29–40. doi:10.1023/A:1006991809927
- Schulze, C., Smales, C., Rubin, L. L., e Staddon, J. M. (1997). Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 68(3), 991–1000.
- Séguin, R., Biernacki, K., Rotondo, R. L., Prat, A., e Antel, J. P. (2003). Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(4), 412–419.
- Shah, S. (2011). Novel drug delivery carrier: resealed erythrocytes. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 394–406.
- Shaltiel-Karyo, R., Frenkel-Pinter, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Levy-Sakin, M., Schiller, A., ... Gazit, E. (2013). A Blood-Brain Barrier (BBB) disrupter is also a potent  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) aggregation inhibitor: A novel dual mechanism of mannitol for the treatment of Parkinson Disease (PD). *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17579–17588. doi:10.1074/jbc.M112.434787
- Shang, X., Wang, P., Liu, Y., Zhang, Z., e Xue, Y. (2011). Mechanism of low-frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction. *Journal of Molecular Neuroscience*, 43(3), 364–369. doi:10.1007/s12031-010-9451-9
- Shao, K., Huang, R., Li, J., Han, L., Ye, L., Lou, J., e Jiang, C. (2010). Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *Journal of Controlled Release*, 147(1), 118–126. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.018
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., ... Zlokovic, B. V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(12), 1489–1499. doi:10.1172/JCI10498

- Siegal, T., Rubinstein, R., Bokstein, F., Schwartz, A., Lossos, A., Shalom, E., ... Gomori, J. (2000). In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. *Journal of Neurosurgery*, 92(4), 599–605.
- Solomon, B. (2008). Filamentous Bacteriophage as a Novel Therapeutic Tool for Alzheimer ' s Disease Treatment, 15(2), 193–198.
- Sousa, F., Mandal, S., Garrovo, C., Astolfo, A., Bonifacio, A., Latawiec, D., ... Krol, S. (2010). Functionalized gold nanoparticles: a detailed in vivo multimodal microscopic brain distribution study. *Nanoscale*, 2(12), 2826–2834. doi:10.1039/c0nr00345j
- Spigelman, M. K., Zappulla, R. A., Strauchen, J. A., Feuer, E. J., Johnson, J., Goldsmith, S. J., ... Holland, J. F. (1986). Etoposide induced blood-brain barrier disruption in rats: duration of opening and histological sequelae. *Cancer Research*, 46(3), 1453–1457.
- Spigelman MK, Zappulla RA, Johnson J, Goldsmith SJ, Malis LI, H. J. (1984). Etoposide-induced blood-brain barrier disruption. Effect of drug compared with that of solvents. *Journal of Neurosurgery*, 61(4), 674–678.
- Steinfeld, U., Pauli, C., Kaltz, N., Bergemann, C., e Lee, H. H. (2006). T lymphocytes as potential therapeutic drug carrier for cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1-2), 229–236. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.12.040
- Streit, W. J., Conde, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E., e Mariani, C. L. (2005). Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurological Research*, 27(7), 685–691. doi:10.1179/016164105X49463
- Sundaresan, N., e Suite, N. D. (1989). Optimal use of the Ommaya reservoir in clinical oncology. *Oncology (Williston Park)*, 3(12), 15–23.
- Thévenot, E., Jordão, J. F., Reilly, M. O., Markham, K., Foust, K. D., Kaspar, B. K., ... Aubert, I. (2011). Targeted Delivery of scAAV9 to the brain using MRI-guided focused ultrasound. *Molecular Therapy*, 1–29. doi:10.1089/hum.2012.013
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., e Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7735–7738. doi:10.1073/pnas.84.21.7735
- Thorne, R. G., Emory, C. R., Ala, T. A., e Frey, W. H. (1995). Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Research*, 692(1-2), 278–282. doi:10.1016/0006-8993(95)00637-6
- Tilloy, S., Monnaert, V., Fenart, L., Bricout, H., Cecchelli, R., e Monflier, E. (2006). Methylated  $\beta$ -cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(8), 2154–2157. doi:10.1016/j.bmcl.2006.01.049

- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., e Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2–11. doi:10.4103/2230-973X.96920
- Tomita, M., Hayashi, M., e Awazu, S. (1996). Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(6), 608–611. doi:10.1021/js9504604
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81–91. doi:10.1016/S0928-0987(00)00166-4
- Treat, L. H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., e Hynynen, K. (2012). Improved Anti-Tumor Effect of Liposomal Doxorubicin After Targeted Blood-Brain Barrier Disruption by MRI-Guided Focused Ultrasound in Rat Glioma. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 38(10), 1716–1725. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.04.015
- Tsuji, A. (2005). Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(1), 54–62. doi:10.1602/neurorx.2.1.54
- Tsuji, A., Saheki, A., Tamai, I., e Terasaki, T. (1993). Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(3), 1085–1090.
- Tucker, I. G., Yang, L., e Mujoo, H. (2012). Delivery of drugs to the brain via the blood brain barrier using colloidal carriers. *Journal of Microencapsulation*, 29(5), 475–486. doi:10.3109/02652048.2012.658445
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *Journal of Neurochemistry*, 117(2), 333–345. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07208.x.
- Van Rooijen, N., Sanders, A. (1998). The macrophage as target or obstacle in liposome-based targeting strategies. *International Journal of Pharmaceutics*, 162(1-2), 45–50.
- Verma, A., e Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 6(1), 12–21. doi:10.1002/smll.200901158
- Veronese, F. M., e Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10(21), 1451–1458. doi:10.1016/S1359-6446(05)03575-0
- Villiers, M., Aramwit, P., Kwon, G. (2009). Nanotechnology for Cancer Chemoteraphy. In *Nanotechnology in Drug Delivery* (pp. 491–513).
- Vinogradov, S., Batrakova, E., e Kabanov, A. (1999). Poly(ethylene glycol)-polyethyleneimine NanoGel (TM) particles: novel drug delivery systems for

- antisense oligonucleotides. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16, 291–304. doi:10.1016/s0927-7765(99)00080-6
- Vinogradov, S. V., Batrakova, E. V., e Kabanov, A. V. (2004). Nanogels for Oligonucleotide Delivery to the Brain. *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 50–60. doi:10.1021/bc034164r
- Vinogradov, S. V., Bronich, T. K., e Kabanov, A. V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: Preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 135–147. doi:10.1016/S0169-409X(01)00245-9
- Vlachos, F., Tung, Y. S., e Konofagou, E. (2011). Permeability dependence study of the focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening at distinct pressures and microbubble diameters using DCE-MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 66(3), 821–830. doi:10.1002/mrm.22848
- Vorbrodt, A. W., Dobrogowska, D. H., Ueno, M., e Lossinsky, A. S. (1995). Immunocytochemical studies of protamine induced blood-brain barrier opening to endogenous albumin. *Acta Neuropathologica*, 89(6), 491–499. doi:10.1007/s004010050280
- Vyas, S., e Khar, R. (2007). Drug delivery to the brain. In *Targeted and Controlled Drug Delivery: Novel Carrier Systems* (1ª edição., pp. 487–509). CBS Publishers and distributors.
- Wang, B, Siahaan, T, Soltero, R. (2005). Pathways for Drug Delivery To The Central Nervous System. In *Drug Delivery: Principles and Applications* (pp. 29–56). USA: John Wiley e Sons, Inc.
- Warren, K., Jakacki, R., Widemann, B., Aikin, A., Libucha, M., Packer, R., ... Balis, F. M. (2006). Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58(3), 343–347. doi:10.1007/s00280-005-0172-7
- Webster, R., Elliott, V., Park, B. K., Walker, D., Hankin, M., Taupin, P., e Veronese, F. M. (2009). PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In *PEGylated Protein Drugs Basic Science and Clinical Applications* (pp. 127–146). doi:10.1007/978-3-7643-8679-5
- Weperen, W, Gaillard, P. (s.d.). Enhanced Blood to Brain Drug Delivery. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, 55–57.
- Williams, K., Alvarez, X., e Lackner, A. A. (2001). Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *GLIA*, 36(2), 156–164. doi:10.1002/glia.1105
- Witt, K. A., e Davis, T. P. (2006). CNS drug delivery: opioid peptides and the blood-brain barrier. *The AAPS Journal*, 8(1), 76–88. doi:10.1208/aapsj080109

- Wu, D., Yang, J., e Pardridge, W. M. (1997). Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1804–1812. doi:10.1172/JCI119708
- Wu, J., Wang, C., Sun, J., e Xue, Y. (2011). Neurotoxicity of silica nanoparticles: Brain localization and dopaminergic neurons damage pathways. *ACS Nano*, 5(6), 4476–4489. doi:10.1021/nn103530b
- Yamamoto, M., Ikeda, K., Ohshima, K., Tsugu, H., Kimura, H., Tomonaga, M. (1997). Increased expression of low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor in human malignant astrocytomas. *Cancer Research*, 57(13), 2799–2805.
- Yan, Q., Matheson, C., Sun, J., Radeke, M. J., Feinstein, S. C., e Miller, J. A. (1994). Distribution of intracerebral ventricularly administered neurotrophins in rat brain and its correlation with trk receptor expression. *Experimental Neurology*, 127(1), 23–36. doi:10.1006/exnr.1994.1076
- Yorulmaz, H., Seker, F. B., e Oztas, B. (2011). The effects of hypoglycemic and alcoholic coma on the blood-brain barrier permeability. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(2), 108–112.
- Ze, Y., Zheng, L., Zhao, X., Gui, S., Sang, X., Su, J., ... Hong, F. (2013). Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*, 92(9), 1183–1189. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.094
- Zhang, X., Chen, G., Wen, L., Yang, F., Shao, A., Li, X., ... Mu, L. (2013). Novel multiple agents loaded PLGA nanoparticles for brain delivery via inner ear administration: in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 48(4-5), 595–603. doi:10.1016/j.ejps.2013.01.007
- Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003
- Zou, J., Pyykkö, I., Counter, S. A., Klason, T., Bretlau, P., e Bjelke, B. (2003). In vivo observation of dynamic perilymph formation using 4.7 T MRI with gadolinium as a tracer. *Acta Oto-Laryngologica*, 123(8), 910–915. doi:10.1080/00016480310000548
- <http://www.europeanbraincouncil.org/>, consultado em 25/09/2014.
- <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm337872.htm>, consultado em 15/09/2014.
- <http://www.tobbb.com/Pipeline/Pipeline>, consultado em 17/02/2014.

<http://ir.raptorpharma.com/releasedetail.cfm?releaseid=633940>, consultado em 09/09/2014.

[www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=656297&version=HealthProfessional](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=656297&version=HealthProfessional), consultado em 11/08/2014.

<http://www.fusfoundation.org/diseases-and-conditions/brain-disorders/brain-tumor>, consultado em 16/07/2014.

<http://www.manualmerck.net/?id=104&cn=933>, consultado em 13/08/2014.

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000317/WC500035649.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000317/WC500035649.pdf), consultado em 09/09/2014.

<http://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/resources/about-your-ommaya-reservoir-placement-surgery>, consultado em 21/08/2014.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Ommaya\\_reservoir](http://en.wikipedia.org/wiki/Ommaya_reservoir), consultado em 21/08/2014.