

Ana Lúcia Gerardo Agostinho

Nanoestratégias para cedência de fármacos ao SNC e sua aplicação na neurodegeneração

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Francisco Veiga, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



Eu, _____, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008021446, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

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

Coimbra, _____ de _____ de 2013.

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
CONTEXTUALIZAÇÃO DA NANOMEDICINA	6
A VIABILIDADE DA NANOTECNOLOGIA NA CEDÊNCIA DE FÁRMACOS AO SNC	7
BHE: O “CALCANHAR DE AQUILES” NA CEDÊNCIA DE FÁRMACOS AO MICROAMBIENTE CEREBRAL	11
VIAS DE ADMINISTRAÇÃO PARA TRANSPOSIÇÃO DA BHE.....	13
REQUISITOS DAS NANOPARTÍCULAS PARA A PASSAGEM DA BHE.....	13
IMPLICAÇÕES DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS NA BHE.....	14
MECANISMOS DE PASSAGEM DA BHE PELAS NANOPARTÍCULAS ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁶⁾ ⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾	15
FATORES CONDICIONANTES DA CEDÊNCIA DE FÁRMACOS POR NANOPARTÍCULAS.....	16
1) <i>Difusão das nanopartículas no parênquima cerebral</i>	16
2) <i>Efeito da proteína Corona</i>	16
3) <i>Alterações da BHE em doenças neurológicas</i>	17
4) <i>Tamanho</i>	17
5) <i>Forma</i>	17
TIPOS DE NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS PARA ATINGIR SNC.....	17
1) <i>Nanopartículas lipídicas</i>	17
a) <i>Lipossomas</i>	17
b) <i>Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN)</i>	18
2) <i>Nanopartículas baseadas em polímeros</i>	18
a) <i>Nanopartículas poliméricas</i>	18
b) <i>Micelas poliméricas</i>	18
c) <i>Dendrímeros</i>	18
NANOTECNOLOGIA NO COMBATE À NEURODEGENERAÇÃO	19
PRIORIDADE DE INTERVENÇÃO	19
POTENCIAL DE NEUROPROTEÇÃO E NEUROREGENERAÇÃO	20
APLICAÇÕES DA NANOMEDICINA A DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ⁽⁸⁾ ⁽³⁾	21
DISCUSSÃO/ CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA. VIAS DE TRÁFEGO MOLECULAR ATRAVÉS DA BHE: A- TRANSPORTE AQUOSO PARACELULAR; B- TRANSPORTE TRANSCELULAR LIPOFÍLICO; C- TRANSCITOSE MEDIADA POR RECEPTOR; D- TRANSCITOSE MEDIADA POR ADSORÇÃO. FONTE: RE, F.; GREGORI, M.; MASSERINI, M.; NANOTECHNOLOGY FOR NEURODEGENERATIVE DISORDERS; NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE; 2012..... 7

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: OS 10 CRITÉRIOS FUNDAMENTAIS PARA I&D DE CEDÊNCIA DE FÁRMACOS AO CÉREBRO, SEGUNDO WEPEREM E GAILLARD, 2011. FONTE: WEPEREN, W. E GAILLARD, P.; ENHANCED DRUG DELIVERY TO THE BRAIN: SAFE AND VERSATILE; DELIVERY SYSTEMS; 2011..... 8

TABELA 2: VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NA CEDÊNCIA DE FÁRMACOS..... 9

TABELA 3: MODIFICAÇÕES DA BHE EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. FONTE: CHEN, Y.; LIU, L.; MODERN METHODS FOR DELIVERY OF DRUGS ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER; ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS; 201214

TABELA 4: MECANISMOS PELOS QUAIS AS NANOPARTÍCULAS TRANSPÕEM A BHE.15

TABELA 5: ESTUDOS DE NANOTECNOLOGIA APLICADOS A DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. FONTE: NUNES, A.; JAMAL, K.; ET AL; THERAPEUTICS, IMAGING AND TOXICITY OF NANOMATERIALS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM; JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE; ABRIL 2012.21

Abreviaturas

BHE – Barreira Hematoencefálica

I&D – Investigação e Desenvolvimento

LDLR – Receptor das lipoproteínas LDL

NP – Nanopartícula

NPs – Nanopartículas

PAMAM – Poli (aminoamina)

PEG – Polietilenoglicol

PLGA – Poli (Ácido láctico-co-ácido glicólico)

SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas (tradução portuguesa)

SNC – Sistema Nervoso Central

RESUMO

O sistema nervoso central é protegido por barreiras que controlam a entrada dos compostos para o cérebro, regulando desta forma a homeostase cerebral. Várias estratégias estão a ser desenvolvidas para aumentar a quantidade e a concentração terapêutica dos fármacos neste microambiente. Apenas a utilização de tecnologias com capacidade de transporte de moléculas através das células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) permitirá uma distribuição homogênea de fármacos no cérebro e, assim, proporcionar uma exposição uniforme e rápida para as células cerebrais.

As doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson não apresentam cura conhecida e a sua incidência aumenta com o envelhecimento da população. Além disso, o tratamento para estas doenças constitui uma área desafiante devido à presença da pouco penetrável BHE e à sua capacidade única para proteger o cérebro de xenobióticos. Existem poucos tratamentos eficazes disponíveis para estas doenças, porque o Sistema Nervoso Central (SNC) é refratário à regeneração axonal e relativamente inacessível para muitos tratamentos farmacológicos.

O cérebro trabalha a uma nanoescala e como tal a nanotecnologia é uma das estratégias mais promissoras para o tratamento destas doenças. Embora seja verdade que muitas nanoferramentas estão ainda num nível de concepção teórica, há também um certo número delas que pode ser aplicado ao processo de desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Esta revisão irá apresentar os principais requisitos para superar a BHE e as mais recentes aplicações da nanotecnologia em algumas doenças neurodegenerativas. A análise conclui também que a aplicação da nanotecnologia à neurodegeneração é ainda embrionária, resultante da incompleta informação sobre o modelo real de funcionamento do cérebro. Além disso, a maioria dos estudos apresenta baixa força de evidência científica, o que pode restringir o investimento nesta área.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Barreira Hematoencefálica; Doenças Neurodegenerativas

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is protected by barriers, which control the entry of compounds into the brain, thereby regulating brain homeostasis. Various strategies are being developed to enhance the amount and concentration of therapeutics compounds in the brain. Only the use of technologies able to transport molecules through the endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB) will allow a homogenous distribution of therapeutics in the brain and thus provide a uniform and rapid exposure to brain cells.

Neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease have no known cure and are increasing in incidence with the aging population. Further, treatment for these disorders is a challenging field due to the presence of tightly regulated BBB and its unique ability to protect the brain from xenobiotics. There are only few effective treatments available for neurodegenerative diseases because the CNS is refractory to axonal regeneration and relatively inaccessible to many pharmacological treatments.

The brain works at the nanoscale and so nanotechnology is one of the most promising opportunities to treat these diseases. While it is true that many tools in the nanotechnology toolbox are still at the concept level, there are also a number of them that can be applied to process and product development of pharmaceuticals.

This review will introduce the main requirements to overcome the BBB and the latest applications of nanotechnology in some neurodegenerative diseases. The review also concluded that the application of nanotechnology to neurodegenerative disorders is still embryonic, resulting from incomplete information on the actual working model of the brain. Furthermore there is low strength of scientific evidence, which in some cases can constrain investments in this area.

Keywords: Nanotechnology; Blood-Brain Barrier; Neurodegenerative Disorders

INTRODUÇÃO

Contextualização da nanomedicina

A nanomedicina concetualiza-se pela aplicação da nanotecnologia à medicina com benefícios para a saúde humana e bem estar. Em 1959, o físico Richar Feynman descreveu a ideia do que considerava ser a nanotecnologia, descrevendo-a como a “utilização de ferramentas para obtenção de ferramentas mais pequenas e assim seguindo até um nível atómico”. Atualmente, a aplicação de nanoestruturas acarreta vários benefícios como a melhoria da exatidão, controlo, versatilidade, custo-efetividade e velocidade de desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento. ^{(1) (2) (3) (4)}

Apesar dos avanços na neurociência, particularmente na última década do século XX, os mecanismos patológicos de várias desordens do sistema nervoso central (SNC) não estão bem compreendidos, o que constitui o chamado “cruzamento” da neurociência. O elemento chave consiste no funcionamento do cérebro a uma nanoescala e como tal, já se compreendeu há muito que se devem utilizar ferramentas destas dimensões para a medição da atividade de circuitos cerebrais e para a melhor manipulação de fármacos neste microambiente. O termo nanocientista é já uma realidade pela enorme disponibilidade de técnicas já desenvolvidas e a desenvolver nesta área. É necessário estudar o circuito cerebral sem interferir no mesmo e o objetivo final é a obtenção de tratamentos eficazes para doenças cerebrais, como as doenças neurodegenerativas, de carácter não invasivo, para pessoas muitas vezes já debilitadas. ^{(2) (5) (6) (7)}

Melhorias através da nanotecnologia permitem a manipulação de complexos sistemas biológicos com grande seletividade e com residuais efeitos adversos. Os nanomateriais apresentam na neurociência uma estratégia tridimensional, com aplicação na cedência de fármacos, na regeneração neuronal e em estratégias neuroprotetoras. ^{(2) (8) (9)}

A nanotecnologia é considerada uma nova aproximação da solução de vários problemas e consiste num conjunto de ferramentas e ideias que podem ser aplicadas, entre diversos setores, à indústria farmacêutica. A sua aplicação ao monopólio farmacêutico contribui para a evolução da era dos “blockbusters” rumo a uma era de medicina personalizada, integrando o tratamento com o diagnóstico. ⁽¹⁰⁾

Esta tecnologia apresenta uma definição muito ténue e vaga, cujos requisitos dependem das instituições que a definem. De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), numa definição de Junho de 2011, a nanotecnologia deve apresentar dois requisitos básicos, a dimensão, de limites aproximados entre o 1nm e os 100 nm ou um segundo

critério em que as propriedades físicas ou químicas estão diretamente dependentes das dimensões das nanopartículas (NPs), mesmo que estas se localizem fora do intervalo da nanociência e já numa microescala. ⁽¹¹⁾

Os fármacos utilizados pela nanotecnologia podem ser novas entidades químicas formuladas com nanomateriais ou corresponder à reformulação de produtos já aprovados, dado que na alteração das dimensões algumas propriedades dos fármacos sofrem modificações, interferindo com o perfil farmacocinético e resultando num melhor ajuste da dose, uma melhor *compliance* e no direcionamento do fármaco (*drug delivery*). ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾

A viabilidade da nanotecnologia na cedência de fármacos ao SNC

Com a limitação da barreira hematoencefálica (BHE), poucas são as opções viáveis para atingir de forma eficaz o parênquima cerebral e conseguir com sucesso uma concentração terapêutica neste microambiente. Com o cérebro a operar a uma nanoescala, a forma mais eficaz e prática será redimensionar as ferramentas terapêuticas a trabalhar nessa escala de dimensões. A nanotecnologia encontra aqui uma potencial aplicação.

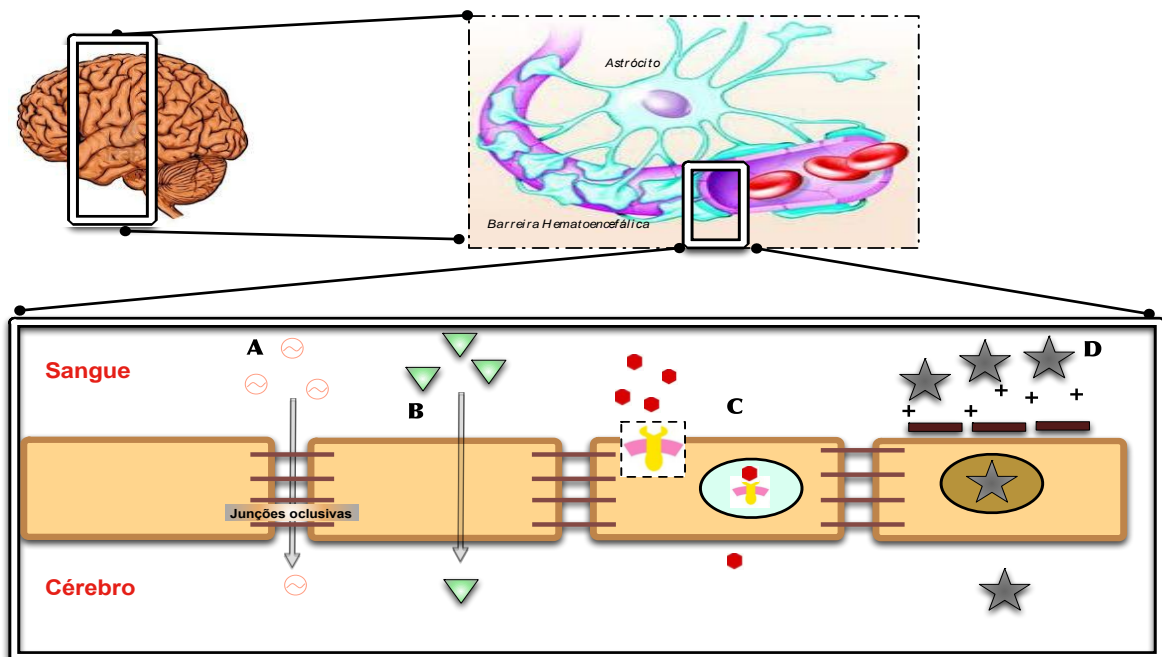


Figura 1: Barreira Hematoencefálica. Vias de tráfego molecular através da BHE: A- Transporte aquoso paracelular; B- Transporte transcelular lipofílico; C- Transcitose mediada por receptor; D- Transcitose mediada por adsorção. Fonte: RE, F.; GREGORI, M.; MASSERINI, M.; *Nanotechnology for neurodegenerative disorders; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*; 2012.

Qual a razão da aplicação da nanotecnologia aos fármacos que têm de atingir o SNC?

A resposta engloba dois conceitos, a dimensão e a área de superfície que, em conjunto, acarretam novas propriedades. O ajuste do tamanho (diminuído) e da área de

superfície (aumentada) melhoram a distribuição (exemplo dos lipossomas), a biodisponibilidade (exemplo dos nanocristais), o perfil de efeitos secundários e a nível da substância ativa potencia-se uma melhor estabilidade da molécula (exemplo das micelas), além da potencialidade de cedência específica do fármaco no local pretendido e do transporte quer de fármacos hidrofílicos, quer hidrofóbicos. Além disso, os nanomateriais permitem explorar várias vias de administração e controlar a libertação no tempo do fármaco, mediante ajustes na matriz das nanopartículas. ^{(3) (11)}

A levodopa, utilizada no tratamento da doença de Parkinson apresenta uma solubilidade limitada e um risco de degradação que podem ser ultrapassados através da sua incorporação em nanoestruturas. ⁽³⁾

Não obstante os benefícios, a eficácia de cedência de fármacos por parte das NPs depende da sua capacidade de invadir o sistema imunitário, de transpor barreiras biológicas e de se acumularem em tecidos alvos. ^{(6) (13) (14)}

Dentro das várias opções existentes de cedência de fármacos ao SNC, os profármacos podem ser utilizados para transpor a BHE. Não obstante, estes apresentam várias limitações, nomeadamente a sua instabilidade (profármacos de glicose) ou o facto de não permitirem o *upload* de grande quantidade de fármaco (profármacos de aminoácidos, como lisina), uma das grandes vantagens das nanoestruturas. ^{(6) (15)}

A reconfiguração química dos fármacos, outra estratégia que pode ser utilizada, resulta frequentemente em perda de atividade farmacoterapêutica, bem como as modificações com vista ao aumento da lipofilia da molécula que podem aumentar a afinidade pela bomba de efluxo glicoproteína P e promover uma menor concentração no SNC. ⁽¹⁶⁾

Por estas razões inumeradas anteriormente, a nanotecnologia supera em vantagens outras estratégias de cedência de fármacos ao parênquima cerebral.

No desenvolvimento de uma estratégia para cedência de fármacos ao SNC devem ser considerados, de acordo com WEPEREM e GAILLARD (2011), 10 critérios: ⁽¹⁷⁾

Alvo: BHE	Transportadores de fármacos	I&D para clínica
Segurança comprovada em receptores biológicos humanos	Não provocar modificações na substância ativa	Produção simples e de baixo custo
Ligando seguro e aplicável a humanos	Capacidade de transporte de várias classes de moléculas	Atividade em todos os modelos animais
Ligação específica ao receptor Aplicável a indicações crónicas e agudas		Forte proteção da propriedade intelectual
Farmacocinética favorável		

Tabela 1: Os 10 critérios fundamentais para I&D de cedência de fármacos ao cérebro, segundo WEPEREM e GAILLARD, 2011. Fonte: WEPEREM, W. e GAILLARD, P.; Enhanced Drug Delivery to the Brain: Safe and Versatile; Delivery Systems; 2011.

Tabela 2: Vantagens e limitações da utilização de nanopartículas na cedência de fármacos.^{(3) (6) (8) (12) (14) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23)}

Vantagens de utilização de NP para cedência de fármacos no SNC	Limitações de utilização de NP para cedência de fármacos no SNC
Alguns métodos de preparação das NPs são simples e de fácil transposição	O pequeno tamanho das NPs e a sua grande área de superfície podem conduzir a agregações entre partículas, dificultando o manuseamento das NPs em formas líquidas e secas
As NPs formadas são estáveis e facilmente liofilizáveis	O pequeno tamanho e grande área de superfície limitam a quantidade de fármaco na nanopartícula (NP) e podem conduzir ao “burst effect” ¹
Permitem a proteção dos fármacos e material genético contra degradação química e enzimática	Embora as NPs apresentem capacidade de incorporar uma quantidade de fármaco considerável, em termos quantitativos é limitada em comparação ao fármaco livre
As NPs atingem com sucesso o tecido alvo, reduzindo efeitos secundários e permitindo uma libertação prolongada	Muitos tipos de NPs não são viáveis farmacologicamente e requerem melhorias no seu perfil físico-químico e de segurança
Diminuição da dose de fármaco necessária, visto que maior percentagem atinge a biofase	A razão risco-benefício derivada do uso das NPs deve ser sempre feita de forma cuidada e atenta para cada tipo de NP
Modificações na superfície de fármacos ligados a NPs previnem a sua rápida clearance por células fagocíticas e pelo sistema reticuloendotelial	Há escassa legislação na área da nanomedicina, o que atrasa o desenvolvimento e a transposição de nanoestratégias para a clínica
Devido ao pequeno tamanho, as NPs penetram em capilares pequenos e são incorporadas pelas células, promovendo uma eficiente acumulação do fármaco nos locais específicos	Um dos mecanismos de algumas das NPs é interromper temporariamente a integridade da BHE, abrindo as junções oclusivas, o que poderá conduzir à passagem de xenobióticos para o parênquima cerebral, conduzindo a efeitos nocivos

¹ Burst effect: Libertação inicial de grande quantidade de fármaco, a uma velocidade elevada.

<p>A utilização de materiais biodegradáveis permite uma libertação sustentada de fármaco no local alvo, mesmo ao fim de dias ou semanas</p>	<p>Alguns dos ligandos utilizados para funcionalizar as NPs podem ser neurotóxicos e imunogénicos, nomeadamente as proteínas catiónicas</p>
<p>O controlo da libertação de fármaco e as características de degradação da NP podem ser modificados pela escolha dos constituintes da matriz da NP</p>	<p>Algumas NPs foram associadas a distúrbios na BHE (NPs de prata), embora os estudos sejam contraditórios nesse sentido</p>
<p>A quantidade de fármaco numa NP é relativamente grande e os fármacos podem ser incorporados no sistema sem reações químicas</p>	<p>Existem NPs que carecem de uma boa caracterização físico-química e da existência de métodos utilizados para esse efeito</p>
<p>Podem ser adicionados ligandos à NP, funcionalizando-a, com vista a uma cedência específica e seletiva do fármaco</p>	<p>A aplicação de NPs a moléculas hidrofílicas de grande dimensões ainda não está comprovada</p>
<p>O sistema pode ser usado para várias vias de administração (oral, nasal, intraocular, parenteral,...)</p>	<p>Existem ainda poucos dados sobre efeitos tóxicos de NPs, particularmente no SNC.</p>
<p>Aumento do tempo de semi-vida do fármaco, diminuindo o número de administrações necessárias</p>	<p>Algumas NPs com resultados promissores <i>in vitro</i> foram rejeitadas após terem demonstrado toxicidade em estudos <i>in vivo</i> São exemplo disso, ensaios <i>in vivo</i> de: i) nanotubos de carbono, ii) <i>quantum dots</i>, iii) fulerenos (“buckyballs”) e iv) NPs de óxido de sílica e de óxido de manganésio (nanopartículas superparamagnéticas) NPs metálicas (prata, cobre, alumínio e dióxido de titânio) demonstraram neurotoxicidade NPs de óxido de ferro demonstraram promover inflamação do parênquima cerebral quando administradas via nervo olfativo</p>
<p>Aumento do tempo de semi-vida do fármaco, diminuindo o número de administrações necessárias</p>	<p>Levantam-se questões de bioética e de legislação sobre nanopartículas, ainda por estabelecer</p>

BHE: o “calcanhar de Aquiles” na cedência de fármacos ao microambiente cerebral.

A luta contra as doenças neurodegenerativas acontece à porta do cérebro. O SNC além de complexo é também um sistema bastante vulnerável e ao longo da evolução humana os mecanismos de defesa também eles se foram aperfeiçoando contra agentes estranhos. ⁽⁷⁾
^{(16) (24) (25)}

Existem 3 principais barreiras que regulam as trocas moleculares entre a corrente sanguínea e o parênquima cerebral, incluindo a BHE, que resulta de interações entre as células gliais e células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais; o epitélio do plexo coróide (dobras da pia-máter ricas em vasos sanguíneos), que constitui a borda entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano e o epitélio aracnóide, que separa o sangue do líquido cefalorraquidiano subaracnóide. ^{(6) (24) (26) (27)}

Muitos dos fármacos que objetivam o SNC apresentam alta eficácia para os seus alvos, no entanto não conseguem atingir o microambiente neuronal. Isso conduz a maus resultados no seu processo de desenvolvimento e suspensão do mesmo, a maioria das vezes por efeitos em outros alvos secundários e pela toxicidade da dose fora do SNC. Isto acontece em 98% das pequenas moléculas e todos os fármacos biotecnológicos, como proteínas recombinantes, que são de elevado peso molecular. ⁽¹⁵⁾

O SNC é um dos compartimentos mais difíceis de alcançar e a principal razão é a BHE, uma estrutura complexa formada por um sistema de interações entre pelo menos quatro tipos de células, células endoteliais, da astroglia, perícitos e células perivasculares. ⁽¹⁴⁾
⁽¹⁵⁾

A BHE é a principal via de troca e é formada principalmente por células endoteliais de capilares cerebrais altamente polarizadas e seladas por um complexo de junções oclusivas que restringem o transporte paracelular das moléculas para o cérebro, com vista a assegurar a homeostase cerebral. As junções desempenham duas funções: i) previnem a passagem de pequenas moléculas e iões através do espaço intercelular, assim a sua passagem terá de ser realizada por difusão ou transporte ativo, controlando o tipo e a quantidade de substâncias às quais se permite a passagem e ii) previnem o movimento de proteínas membranares integrais entre as membranas apical e basolateral da superfície celular e desta forma cada superfície da célula pode preservar as suas funções peculiares (endocitose mediada por receptores na superfície apical e exocitose na superfície basolateral). ^{(6) (14) (24) (25)}

O circuito compacto de interconexões confere à camada endotelial da BHE uma resistência transeleétrica superior $1500 \Omega \text{ cm}^2$, a maior de entre outros locais constituídos por células endoteliais. ⁽¹⁴⁾

O transporte paracelular é limitado como resultado da alta atividade metabólica, do baixo transporte vesicular e da falta de capilares fenestrados. Além disso, a BHE está intimamente associada a astrócitos que formam uma rede que envolve os vasos sanguíneos, fornecendo suporte bioquímico às células endoteliais, importante para a eficiência desta barreira, tal como os perócitos, que apresentam funções fagocíticas. As terminações neuronais encontram-se também presentes, junto destas células. Tal complexidade impede a passagem de moléculas grandes, como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos nucleicos. Dentro das moléculas pequenas, apenas 2% apresenta capacidade para atravessar a BHE, com favorecimento para as moléculas com elevada solubilidade lipídica. ⁽⁸⁾

⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁷⁾

Enquanto sistema dinâmico, a BHE permite uma difusão limitada de compostos exógenos para o cérebro através de mecanismos de transporte especializados para nutrientes essenciais. A absorção de moléculas pode ocorrer através de dois mecanismos: transporte passivo ou transporte ativo. O transporte passivo inclui difusão paracelular de compostos hidrofílicos e transporte transcelular de moléculas lipofílicas pequenas (menos de 400-600 Da) para o parênquima cerebral. Os sistemas de transporte ativo incluem transcitose mediada por transportadores de moléculas relativamente pequenas; transcitose mediada por adsorção de péptidos carregados positivamente e transcitose mediada por receptores (Fig.1). O primeiro tipo de transcitose referido é o mais predominante no transporte de nutrientes e o *ratio* de transporte depende da percentagem de ocupação dos carregadores. Além dos sistemas de transporte, também os sistemas de efluxo estão presentes na dinâmica cerebral, com maior relevância para a glicoproteína P, que se encontra em grande concentração. Esta proteína é dependente de ATP (trifosfato de adenosina) e inibe a penetração de fármacos com peso molecular superior a 400 Da e hidrofóbicos, sendo responsável pelo seu efluxo para a corrente sanguínea. Estes sistemas de proteção e de efluxo confluem para uma elevada restrição de fármacos. ⁽⁶⁾ ⁽⁸⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽²⁶⁾

A BHE é permeável a moléculas pequenas e lipofílicas (exemplo do oxigénio, dióxido de carbono e nicotina) e moléculas maiores, que não conseguem transpor esta barreira por difusão, fazem-no através de transportadores específicos (exemplo dos sistemas utilizados para o transporte da glicose e de aminoácidos) ou por sistemas de endocitose mediados por receptores (exemplo dos sistemas usados para a leptina, insulina ou transferrina) presentes na membrana das células endoteliais e já referidos anteriormente. Moléculas que não

consigam utilizar estes sistemas têm de utilizar outras estratégias para atingir o parênquima cerebral. É aqui que a nanotecnologia encontra a sua melhor oportunidade. ^{(6) (24) (28)}

Vias de administração para transposição da BHE

Uma forma de evitar a BHE é a administração direta via injeção intraparenquimal da substância desejada. Outra opção é a implementação de sistemas, como bombas osmóticas ou dispositivos convencionais melhorados, para uma infusão dos fármacos de forma contínua. No entanto, técnicas cirúrgicas são invasivas, de risco e não viáveis quando o dispositivo se destina a zonas críticas cerebrais.

Outras vias de administração têm sido exploradas para circundar a BHE, nomeadamente as vias de migração das terminações dos nervos olfativo e trigémio que ocorrem após deposição do fármaco nas mucosas olfativa e nasal, respetivamente, e que constituem uma alternativa não invasiva de *bypass* à BHE, facilitando a cedência de moléculas terapêuticas ionicamente carregadas e de alguma dimensão. ^{(24) (25) (29)}

Em vez do *bypass* da BHE, é possível interromper temporariamente esta barreira de defesa do organismo por abertura das junções oclusivas entre as células que a constituem. Seguindo esta estratégia a permeabilidade da BHE estará temporariamente aumentada, o que tem igualmente efeitos nefastos, pela possível passagem de substâncias tóxicas. ⁽²⁴⁾

Requisitos das nanopartículas para a passagem da BHE

Nem todos os tipos de nanopartículas são viáveis para utilizar numa estratégia cujo objetivo é o de cruzar a BHE. As **características de superfície** variam consoante os nanomateriais utilizados e verificou-se que nanopartículas neutras e de baixa concentração aniónica não apresentam efeitos a nível desta barreira. Por outro lado, nanopartículas com alta concentração de cargas aniónicas ou de cargas catiónicas são tóxicas para a BHE. ⁽²⁹⁾

Estudos demonstraram que a extensão do *uptake* cerebral de nanopartículas aniónicas é superior ao de nanopartículas catiónicas e neutras. Desta forma, as **cargas de superfície** das NPs devem ser consideradas no perfil de neurotoxicidade e nos perfis de distribuição cerebral. ⁽²⁹⁾

As nanoestruturas com revestimento (*coating*) de polissorbato (Tween) conseguem atravessar a BHE e conseguem-no através de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) que se encontram nas células endoteliais após uma adsorção das lipoproteínas do plasma sanguíneo para as nanopartículas. É com base neste mecanismo que se utilizam como

ligantes em nanopartículas marcadas com apolipoproteínas E, cujo papel já se encontra comprovado na passagem de fármacos pela BHE. ⁽²⁹⁾

Para transpor a BHE são três os factores a considerar: o tamanho molecular (<500 Da), a carga (baixa capacidade de formar pontes de hidrogénio) e a lipofilia (quanto maior, melhor o transporte). ⁽¹⁶⁾

Além da estrutura das nanopartículas, também as características dos fármacos devem ser reestruturadas para facilitar a passagem para o SNC. Certas características devem ser mascaradas para prevenir ou limitar os sistemas de efluxo. ⁽²⁹⁾

Implicações das doenças neurodegenerativas na BHE

A BHE sofre modificações significativas quando o cérebro desenvolve um processo patológico ou perante condições inflamatórias desencadeadas por diversos mecanismos. Estas alterações vão afectar a sua dinâmica e as suas vias de transporte, apresentando implicações também no transporte de fármacos. ⁽³⁰⁾

A dinâmica estrutural da BHE fica alterada de forma a potenciar, na maioria dos casos, o transporte dos fármacos, o que ocorre nas doenças neurodegenerativas. Desta forma, o que antes era inacessível agora encontra uma maior facilidade em atingir o parênquima cerebral. Embora esta perda de integridade da BHE contribua para uma acessibilidade tão desejada e pouco alcançada, estudos demonstraram que a mesma também conduz a uma maior neurodegeneração, pela passagem de substâncias nocivas, anteriormente limitadas. Ou seja, restaurar a BHE nestas doenças poderá ser mais importante do que aproveitar a sua perda de integridade para a cedência de fármacos. ⁽³⁰⁾

Durante os processos patológicos ficam afetados a permeabilidade da BHE, os sistemas e vias de transporte e os circuitos de tráfego de monócitos e macrófagos. ⁽³⁰⁾

Tabela 3: Modificações da BHE em doenças neurodegenerativas. Fonte: CHEN, Y.; LIU, L.; Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier; Advanced Drug Delivery Reviews; 2012

CONDIÇÃO PATOLÓGICA	IMPACTO NA BHE	CONSEQUÊNCIA NA PASSAGEM DE FÁRMACOS PELA BHE
Esclerose Múltipla	Interrupção das junções oclusivas; atividade leucocitária aumentada; libertação de citocinas inflamatórias	Pode aumentar o transporte paracelular de fármacos
Doença de Alzheimer	Interrupção da BHE e permite um maior acesso de IgG periféricas para o SNC	Pode aumentar o transporte paracelular de fármacos com afinidade para a albumina e de IgG para o SNC
Doença de Parkinson	Interrupção da integridade da BHE	Aumento da concentração terapêutica de fármacos no SNC

Mecanismos de passagem da BHE pelas nanopartículas ^{(14) (16) (25) (26) (27) (31) (32)}

Tabela 4: Mecanismos pelos quais as nanopartículas transpõem a BHE.

Mecanismo de transposição da BHE	Características das nanopartículas	Tipo de nanopartículas (exemplos)	Detalhes	Mecanismo
Transposição sem funcionalização	Materiais permeáveis à BHE	NPs de sílica NPs de ouro NPs de dióxido de titânio (PM<40 nm)	NPs Sílica: acumulam-se no striatum NPs de ouro: acumulam-se no hipocampo, tálamo e hipotálamo	Desconhecido
Transcose mediada por adsorção	Tornam-se permeáveis devido à presença de péptidos penetradores de células e de proteínas catiónicas (ex. albumina)	<u>Nanopartículas anfipáticas:</u> NPs de extratos lipídicos (lipoproteínas) e com cargas catiónicas do grupo colesteril e etanolamina. <u>Nanopartículas com péptidos com capacidade de penetrar células e proteínas catiónicas (ex. albumina):</u> Péptidos TAT (derivados do HIV) ancorados a NPs	Sujeitas a uma mais rápida eliminação do organismo (<i>clearance</i> sistémica) devido à sua carga positiva. A capacidade de proteínas catiónicas transporem eficazmente a BHE conduz a questões sobre a sua toxicidade e imunogenicidade. A administração de grandes quantidades de proteínas catiónicas conduz a uma possível interrupção da integridade da BHE. Desvantagens: Falta de seletividade tecidual, processo pouco eficaz e possível interrupção da BHE	Funcionalização das nanopartículas com cargas positivas, permitindo interações electrostáticas com a superfície luminal da BHE, que apresenta cargas negativas
Transcose mediada por receptor	Utilizam os transportadores específicos de macromoléculas existentes na superfície luminal celular. <u>Ex. de receptores:</u> Receptor de lipoproteínas Receptor da transferrina Receptor da insulina	NPs de látex funcionalizadas NPs de ouro, quitosano, PLGA, PAA, dendrímeros e lipossomas funcionalizados NPs com apolipoproteína E (via LDLR e LRP): NP PBCA revestida por polissorbatato 80 NP PHDCA de albumina	NPs de látex com diâmetro ≥500 nm são interiorizadas por células B16 via caveola; NP com diâmetro >200 nm são interiorizadas via clatrina (ex. NP de hidroxilato de sílica) Grande parte das NPs sem revestimento seguem a via caveola Uma das estratégias reconhecida pela comunidade científica como a de mais provável sucesso Desvantagens: Deve considerar-se a cinética de transporte, os requisitos de ligação estrutural ao receptor, garantir que o composto liga ao receptor e se mantém ativo <i>in vivo</i> . Alguns estudos são contraditórios.	Carga extracelular é interiorizada através de vesículas (via clatrina ou via caveola), mediante interação prévia com receptores já existentes na superfície da célula. Este mecanismo é o responsável pela entrada de moléculas como a insulina, transferrina, apolipoproteínas e macroglobulina 2.
Transporte retrógrado transsináptico	<i>Dados insuficientes</i>	NPs modificadas com PEI e outros políplexos NP PLGA com curcumina conjugadas com péptidos	Na maioria dos casos são incapazes de mediar ações biológicas eficazes. Neurónios do epitélio olfativo apresentam sistemas de transporte retrógrado transsináptico	<i>Dados insuficientes</i>
Exploração da infiltração de monócitos/macrófagos no SNC	<i>Dados insuficientes</i>	Nanopartículas nanoporosas de silício revestidas com membranas de leucócitos	Estudos sugerem que os monócitos são os maiores transportadores de lipossomas para o cérebro	Transposição da BHE através de: i) incorporação de NPs em monócitos ou ii) Desenho de NPs que mimetizam monócitos ativados
Silenciamento temporário da Glicoproteína P	<i>Dados insuficientes</i>	NPs de quitosano-SiRNA	O quitosano é um biopolímero catiónico que demonstrou ser a melhor estratégia para cedência de SiRNA ao SNC As NPs protegem o SiRNA de degradação e facilitam o <i>uptake</i>	Silenciamento (SiRNA) do gene da glicoproteína P, bloqueando o efluxo de fármacos do parênquima cerebral

Abrev.: TAT – Ativador de Transcrição; PLGA – Poli (Ácido láctico-co-ácido glicólico); PAA – Ácido poliâmico; LDLR – Receptor das lipoproteínas LDL; LRP – Proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade; PBCA – Poli(butilcianoacrilato); PHDCA – Poli (hexadecilcianoacrilato); PEI – Polietirimida; SiRNA – pequenos fragmentos de RNA de interferência.

Fatores condicionantes da cedência de fármacos por nanopartículas

Diferentes características físico-químicas condicionam a cedência de fármacos ao cérebro por NPs. Os principais fatores são:

1) Difusão das nanopartículas no parênquima cerebral

Ao utilizar NPs para cedência de fármacos no SNC, espera-se que teoricamente exista uniformidade de cedência, maior duração da ação do fármaco e uma cedência efetiva da substância ativa pretendida ao local alvo. Atualmente está bem definido que o espaço extracelular ocupa uma fração de volume entre os 15% e os 30% num tecido cerebral adulto sem lesões. ⁽¹⁴⁾

Não é só a cedência de fármacos ao parênquima cerebral que deve ser considerada, mas a difusão de cedência da substância ativa é fundamental para que esta atinja a biofase. Esta difusão pode ser condicionada por vários fatores entre os quais: obstruções celulares, aprisionamento do fármaco em microdomínios celulares, impedimento da boa velocidade de difusão devido à natureza viscosa e/ou à natureza aniónica de moléculas que compõem a matriz extracelular e estabelecimento de ligações transientes a membranas celulares ou à matriz extracelular. ⁽¹⁴⁾

Estudos revelam que NPs de dimensões muito reduzidas podem ter problemas de difusão no parênquima cerebral. Por sua vez, NPs com 114 nm difundem-se bem no cérebro humano quando revestidas com polietilenoglicol (PEG). Estima-se que o espaço extracelular apresente poros com diâmetro superior a 200 nm e que um quarto dos poros apresentem um diâmetro superior a 100 nm ⁽¹⁴⁾

2) Efeito da proteína Corona

Quando em torno da nanoestrutura se forma um revestimento por adsorção de biomoléculas plasmáticas à superfície da NP, a este revestimento é dado o nome de “corona”. A sua constituição depende do tipo de biomoléculas a que esteve exposta a NP e depende das características de superfície dos nanomateriais. A formação da “corona” condiciona a passagem entre compartimentos cerebrais e o *uptake* celular. ⁽³²⁾

É inevitável a interação das nanoestruturas com as biomoléculas endógenas (como proteínas séricas) e este revestimento formado pode ativar vias que conduzam a efeitos secundários indesejáveis, como a ativação do sistema complemento. ⁽¹⁴⁾

3) Alterações da BHE em doenças neurológicas

A BHE apresenta uma grande variabilidade de alterações em doenças do foro neurológico. Como as alterações dependem do tipo de doença, torna-se difícil prever os efeitos de um fármaco em específico. Estas alterações podem provocar mudanças de dose, de eficácia e dos efeitos secundários dos fármacos. ⁽⁷⁾

Na esclerose múltipla ocorre uma migração de leucócitos para o cérebro, o que provoca um aumento da permeabilidade das suas barreiras. Também na doença de Alzheimer a integridade da BHE está afectada, provocando uma diminuição de oxigénio e glicose no parênquima cerebral. ⁽⁷⁾

Antes de estruturar um fármaco para o tratamento destas doenças neurodegenerativas é necessário primeiro estudar bem as alterações da BHE, e adaptar as características das nanoestruturas à mesma (Tabela 3). ^{(6) (7) (14)}

4) Tamanho

Este fator encontra-se muitas vezes subvalorizado pelo departamento de investigação e desenvolvimento (I&D) das indústrias farmacêuticas. Estudos recentes revelam que os tamanhos das NPs devem ser analisados à luz da via de administração que vai ser utilizada e que as mesmas podem transpor a BHE seja qual for a via de administração. ⁽¹⁴⁾

5) Forma

A forma das NPs também é importante, principalmente no que diz respeito ao perfil neurotoxicológico. NPs esféricas causam uma pequena ativação da microglia presente durante pelo menos uma semana, em contraposição com NPs de geometrias mais desorganizadas, que causam uma ativação transiente da microglia. ⁽¹⁴⁾

Tipos de nanopartículas utilizadas para atingir SNC

1) Nanopartículas lipídicas

a) Lipossomas

Os lipossomas são a primeira geração de NPs e são constituídos por bicamadas lipídicas compostas por lípidos anfífilicos a delimitar um interior aquoso. Compostos comuns que constituem estas estruturas são a esfingomielina, a fosfatidilcolina, glicerofosfolípidos e o colesterol. Os lipossomas são classificados com base no número de camadas lipídicas e no seu tamanho em (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), com um tamanho <100 nm e uma única lamela lipídica, (ii) Vesículas unilamelares grandes (LUV), com um tamanho >100 nm e uma lamela lipídica e (iii) Vesículas multilamelares (MLV), com lamelas lipídicas concêntricas e que podem atingir a escala micrométrica. ^{(6) (14) (25)}

Dentro dos lipossomas, existem os lipossomas catiónicos que contêm lípidos carregados positivamente e cujo objetivo inicial de desenvolvimento foi a transfecção de material genético, formando “lipoplexos”. Revelam-se também benéficos para a cedência de fármacos ao SNC. ⁽¹⁴⁾

b) Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN)

Estas partículas são nanotransportadores à base de lípidos, com um núcleo lipídico hidrofóbico sólido, no qual o fármaco é dissolvido ou disperso. Na sua constituição encontram-se triglicéridos, ácidos gordos ou ceras. O seu tamanho normalmente situa-se entre os 40 – 200 nm e desta forma são uma boa opção para transpor as células endoteliais do cérebro. Apresentam as vantagens de libertação gradual do fármaco e de uma eficiência de incorporação de fármacos superior a outras NPs. ⁽¹⁴⁾

2) Nanopartículas baseadas em polímeros

a) Nanopartículas poliméricas

As NPs poliméricas são compostas por um núcleo de polímeros onde os fármacos podem ser incorporados e o seu tamanho situa-se entre os 60-200 nm. Os polímeros biodegradáveis são os utilizados para aplicações médicas, de entre os quais os mais utilizados são os polímeros sintéticos e semi-sintéticos poliláctidos (PLA), poliglicólidos (PGA), poli (láctido-co-glicólidos) (PLGA), policianoacrilatos, polianidridos e do tipo policaprolactona, bem como o quitosano, que se trata de um polímero natural. ⁽¹⁴⁾

b) Micelas poliméricas

As micelas poliméricas são formadas por copolímeros cuja agregação conduz a uma arquitetura esférica, com um núcleo hidrofóbico e uma camada externa hidrofílica. Um dos polímeros mais utilizados é do tipo plurónico, um copolímero baseado em óxido de etileno-propileno. NPs de quitosano conjugadas com nanotransportadores plurónicos foram utilizadas, com sucesso, em modelos animais para cedência de péptidos ao parênquima cerebral. ⁽³³⁾

c) Dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros ramificados, com repetições e ramificações de grupos químicos, que evocam a arquitetura de uma árvore e que originam espaços onde podem ser incorporados fármacos. Apresentam uma estrutura simétrica e na água adquirem uma estrutura tridimensional esférica. Os polímeros de poli (aminoamina) – PAMAM, são dos mais utilizados para síntese de dendrímeros. ⁽³³⁾

Estudos demonstraram uma óptima penetração e difusão de dendrímeros de PAMAM no SNC via injeção intraventricular ou no parênquima cerebral. ⁽³³⁾

Nanotecnologia no combate à neurodegeneração

As doenças neurológicas incluem um intervalo grande de desordens que afetam uma grande porcentagem da população mundial e segundo os estudos epidemiológicos prevê-se um aumento da incidência resultante do envelhecimento da população. Entre as várias desordens neurodegenerativas encontram-se algumas das mais debilitantes, como as doenças de Parkinson, de Alzheimer, esclerose múltipla e doença de Huntington que são das que mais têm beneficiado com os avanços no conhecimento sobre o sistema nervoso central. Não obstante, muitas destas doenças não podem ser devidamente tratadas consequência da inacessibilidade dos fármacos ao cérebro e da especificidade do microambiente neuronal. ⁽⁶⁾

(7) (8) (14) (17) (24) (25)

As doenças neurodegenerativas são lesões relacionadas com uma perda progressiva e persistente da função cerebral, frequentemente identificadas pelo conseqüente declínio das funções neurológicas. Estas doenças são especialmente atrativas para a ciência por três motivos: difícil detecção e lenta progressão, terapia dependente do doente, com uma tendência à personalização da terapêutica e obrigatoriedade de transposição da BHE por todos os fármacos desenvolvidos e a desenvolver. ^{(8) (17)}

Existem várias opções de entrega de fármacos ao SNC, no entanto, algumas são invasivas ou tendem a interromper a barreira neuroprotetora sangue-cérebro. ⁽¹⁵⁾

O tratamento e o diagnóstico das doenças neurodegenerativas são atualmente considerados os maiores desafios da medicina moderna. Para avançar é necessário desmontar alguns enigmas e falhas de conhecimento que permanecem em relação a estas doenças. A nanomedicina é uma ferramenta que contribui para compreender essas falhas de informação e uma estratégia no desenvolvimento de novas terapêuticas e de novas modalidades de diagnóstico para intervenções neurológicas. ⁽⁸⁾

A aplicação da nanotecnologia como intervenção nas doenças neurodegenerativas continua embrionária, não obstante, vários são os materiais que têm sido utilizados para estudos de processos neuropatológicos. ⁽⁸⁾

Prioridade de intervenção

A prioridade de intervenção em desordens de índole neurológica corrobora-se pela inexistência de mecanismos de autoreparação eficientes, o que resulta em problemas funcionais irreversíveis com grande impacto económico, pessoal e social. Além da vertente de tratamento, a nanotecnologia é a melhor ferramenta disponível para estudar a arquitetura do cérebro e desta forma melhorar a compreensão de doenças com mecanismos

desconhecidos ou pouco claros e com evoluções alarmantes que, a não encontrar soluções, constituirão grandes problemas sociais num futuro próximo. ⁽⁸⁾

Os nanomateriais começaram a ser utilizados para reverter ou limitar processos neuropatológicos e esta capacidade advém da possibilidade dos mesmos interagirem com sistemas biológicos num alto grau de especificidade. Estes materiais apresentam a capacidade de interação com alvos celulares e tecidos de forma controlada, induzindo uma resposta fisiológica desejada com efeitos secundários mínimos. ⁽⁸⁾

Potencial de neuroproteção e neuroregeneração

As nanopartículas podem funcionar nas doenças neurodegenerativas não só como agentes terapêuticos, mas também como agentes neuroprotetores e neuroregeneradores de lesões irreversíveis, constituindo estratégias de modificação da doença. ^{(4) (5) (7) (8)}

O potencial de neuroproteção da nanotecnologia representa uma esperança na redução de eventos neurodegenerativos relacionados com a idade, como o *stress* oxidativo, que contribuem para um dano continuado no tecido cerebral. Na doença de Alzheimer, os curcuminóides, agentes quelantes, como a deferoxamina e a 2-metil-N-(2-aminoetil)-3-hidroxi-4-piridona e espécies antioxidantes como a glutatona e o ácido ferrúlico demonstraram propriedades neuroprotectoras e resultados benéficos para a evolução da doença. ^{(3) (4) (8)}

Além de uma função neuroprotetiva, a nanotecnologia começa a apresentar bons resultados a nível de uma eventual neuroregeneração de estruturas danificadas e promoção do crescimento neuronal. Os nanotubos de carbono demonstraram ser boas estruturas de suporte para células estaminais, que recentemente apresentaram resultados positivos na substituição de neurónios com função já perdida. As células estaminais apresentam baixa razão de sobrevivência, limitação ultrapassada pela sua inclusão em nanotubos de carbono, que apresentam características biomiméticas e propriedades biológicas especiais, como alta área de superfície, elevada condutividade elétrica e elevada estabilidade. As questões de toxicidade levantadas sobre estes nanomateriais são dependentes da sua aplicação, dose, modo de administração e tipo de exposição. ^{(17) (34)}

No âmbito da neuroregeneração, a terapia génica é uma das possíveis aplicações da nanotecnologia, contornando as limitações existentes de segurança associadas a vetores virais já utilizados. Os nanomateriais podem ser utilizados para incluir genes, como o gene da neurotrofina-3, que previne a degeneração neuronal e aumenta a recuperação funcional. ⁽²¹⁾

⁽³⁵⁾

Aplicações da nanomedicina a doenças neurodegenerativas ^{(8) (3)}

Tabela 5: Estudos de nanotecnologia aplicados a doenças neurodegenerativas. Fonte: Nunes, A.; Jamal, K.; et al; Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system; Journal of Controlled Release; Abril 2012.

Sistema de cedência	Modelo	Via	Objetivos e conclusões	Ref.
Nanopartículas Nanoenzima: catalase imobilizada num copolímero catiónico em bloco (PEI / PEG)	Murganho com doença de Parkinson (MPTP+)	Intravenosa	Reduzido stress oxidativo no modelo com doença de Parkinson	(36)
Nanopartículas VP025	Rato com doença de Parkinson (6-OHDA)	Intramuscular	Investigar o efeito neuroprotetor das NPs VP025 na doença de Parkinson (Ensaio Clínico fase II) Redução da ativação da microglia na substância negra de ratos 6-OHDA	(37)
<i>h</i> GDNF entregue via NPs poli-l-lisina	Rato com doença de Parkinson (6-OHDA)	Estereotóxica (na substância negra)	Investigar a eficiência de transfecção do gene <i>h</i> GDNF nos neurónios dopaminérgicos Recuperação bioquímica, anatômica e funcional do modelo pré-induzido da doença de Parkinson	(38)
Fator de crescimento neural (NGF) entregue por NPs PBCA com revestimento de polissorbato 80	Murganho com doença de Parkinson (MPTP+)	Intravenosa	Investigar os efeitos terapêuticos do NGF na neurotoxicidade induzida por MPTP Redução de sintomas básicos do Parkinsonismo: rigidez, oligocinésia e tremor	(39)
Urocortina entregue via nanopartículas PEG-PLGA funcionalizada com lactoferrina	Rato com doença de Parkinson (6-OHDA)	Intravenosa	Investigar o efeito terapêutico da urocortina Atenuação da lesão no striatum	(40)
Tirosina hidroxilase incorporada em NPs	Estudo <i>in vitro</i>	N/A	Caracterizar as NPs de tirosina hidroxilase como passo primário de avaliação de terapia génica de reposição enzimática	(41)
Urocortina entregue via nanopartículas PEG-PLGA funcionalizadas com odorranalectina	Rato com doença de Parkinson (6-OHDA)	Intranasal	Investigar o efeito terapêutico da urocortina Recuperação funcional e comportamental	(42)
Nanopartículas de óxido de cério	Cultura de células (modelo doença de Parkinson)	N/A	Investigar a aplicação de NPs de óxido de cério na doença de Parkinson utilizando um modelo pré-clínico, quimicamente modificado. Confirmar o potencial antioxidante destas NPs.	(43)

	Apomorfina entregue por SLN de monoestearato de gliceril ou SLN de monoestearato de polietilenoglicol	Rato com doença de Parkinson (6-OHDA)	Oral	Investigar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica de SLN com diferentes monoestearatos emulsificadores Atingir o striatum e obter uma melhor eficácia terapêutica na recuperação comportamental	(44)
	Nanopartículas PEG-PHDCA	Células endoteliais de rato com doença de Alzheimer	N/A	Investigar a influência das nanopartículas de PEG-PHDCA na cinética de agregação da placas β -amilóides.	(45)
	Factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) em nanoesferas de PLGA	Murganhos transgênicos para a proteína presinilina-1 (APP/Ps1)	Craniotomia minimamente invasiva	Investigar os efeitos do VEGF encapsulado em nanoesferas no déficit de comportamento, nos depósitos β amilóides e na angiogênese Melhorias no perfil comportamental	(46)
	Curcumina incorporada em nanopartículas (NanoCurc™)	Lisado de células cerebrais de murganhos atímicos	N/A	Investigar o potencial neuroprotetor e antioxidante das NPs de curcumina Resultado positivos de neuroproteção	(47)
	Rivastigmina incorporada em lipossomas (lipossomas RIVA)	Estudo de toxicidade em ratos albinos de Wistar	Subcutânea	Optimizar os métodos de preparação dos lipossomas RIVA e investigar o potencial de toxicidade dos mesmos enquanto sistema de cedência de fármacos ao cérebro em ratos albinos de Wistar	(48)
	Indometacina em nanocápsulas lipídicas	Ratos Wistar com placas β amilóides	Estereotática	Investigar o potencial das nanocápsulas de indometacina no combate aos danos celulares e neuroinflamação induzida pelas placas β amilóides da doença de Alzheimer em ratos Wistar Avaliar a terapia antioxidante	(49)
Fulerenos	C60 fulereno ligados a antagonistas do receptor NMDA	Murganho com esclerose múltipla	Intraperitoneal	Redução da progressão da esclerose múltipla, com diminuição da perda de mielina	(50)
Nanotubos de carbono	Acetilcolina entregue por nanotubos SWNT,	Murganho com doença de Alzheimer	Administração gástrica	Avaliar os efeitos terapêuticos da cedência de acetilcolina Melhorias na comunicação colinérgica, diminuída na doença de Alzheimer	(51)

Abrev.: PEI – Polieterimida; PEG – Polietilenoglicol; MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; VP025 – Preparação de nanopartículas que incorporam fosfatidilglicerol; 6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina; hGDNF: Factor neurotrófico derivado de linhas de células da glia humanas; PBCA – Poli(butilcianoacrilato); PEG- PHDCA – Poli (hexadecilcianocrilato)-co-poli (etilenoglicol cianocrilato); SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas (tradução portuguesa); PLGA – Poli (Ácido láctico-co-ácido glicólico); receptor NMDA – receptor N-metil-D-aspartato; Nanotubos SWNT – Nanotubos de parede única ou simples; N/A: Não aplicável; Ref.: Referência bibliográfica.

DISCUSSÃO/ CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente são vários os tipos de NPs disponíveis para uso médico, utilizando diferentes recursos e facilitando a cedência de moléculas, como fármacos, fatores de crescimento e genes ao cérebro. As nanoferramentas permitem uma nova manipulação de fármacos e conduzem a novos conceitos sobre a arquitetura e funcionamento do SNC, permitindo desmistificar e corrigir falhas de conhecimento científico do campo da neurologia, bem como constituir novas estratégias para campos de tratamento já estagnados e acomodados a terapêuticas principalmente sintomatológicas. ⁽¹⁴⁾

Embora o plano teórico da nanotecnologia aplicada à neurologia seja entusiasmante, no que se refere às evidências poucas são ainda aquelas que demonstram uma eficaz travessia dos nanomateriais pela BHE. É, portanto, imperativo uma elucidação da cinética de translocação das nanoestruturas por esta barreira, para aumentar o conhecimento e o reconhecimento da comunidade científica.

A nanotecnologia apresenta-se como um campo promissor de oportunidades de intervenção em doenças neurodegenerativas. Este tipo de doenças tende a aumentar de incidência e num futuro próximo constituirão a grande “epidemia” da sociedade, conduzindo a uma pesquisa emergente de estratégias que solucionem estes estados debilitantes. Em termos clínicos, os nanomateriais podem criar valor de inovação, nesta altura cada vez mais escasso. Apesar da enorme potencialidade, a comunidade científica ainda a classifica como uma estratégia muitas vezes embriónica e com pouca força de evidência científica, o que nalguns casos pode condicionar investimentos nesta área, os quais são dispendiosos. ⁽⁵²⁾

As vantagens destas estruturas de nanoescala tendem a superar as limitações e os riscos, visto que a restante panóplia de opções apresenta uma razão risco-benefício superior e uma maior inefetividade. Como pontos negativos ressalva-se a escassa e incompleta legislação e a toxicidade desconhecida ou pouco avaliada em ensaios *in vitro* e que leva à rejeição de nanoestratégias em ensaios *in vivo*. Estes problemas começam agora a ser discutidos e avaliados pela comunidade académica, com um interesse aumentado por construir uma base legislativa para a aplicação da nanotecnologia à medicina e à farmacologia. Há igualmente interesse em detalhar os riscos de toxicidade, principalmente neurotoxicidade, resultante, embora que contraditório, do pequeno tamanho, que as torna vantajosas numa primeira abordagem. Apesar das suas potencialidades, a nanotecnologia apresenta riscos e é importante que estes sejam avaliados antes da sua total transposição para a clínica. ⁽³⁾

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FOND, G.; MACGREGOR, A.; Nanopsychiatry—The potential role of nanotechnologies in the future of psychiatry: A systematic review; *European Neuropsychopharmacology*; 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23183130> e consultado a 11 de março de 2013.
2. CETIN, M.; GMRU, S.; et al; Nanotechnology Applications in Neuroscience: Advances, Opportunities and Challenges; *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, Vol: 22, N.: 2; junho 2012. Disponível em http://www.psikofarmakoloji.org/pdf/22_2_1.pdf e consultado a 21 de março de 2013.
3. ARIES, E.; et al.; Applications of nanotechnology in the diagnosis and treatment of Parkinson's Disease; 2010. Disponível em <http://www.medlink-uk.org/Site/documents/Nano2011/AriesE&LeeK&ScraceC.pdf> e consultado a 23 de maio de 2013.
4. NAZEM, A.; MANSOORI, G.; Nanotechnology of Alzheimer's disease detection and treatment; *Neurodegenerative Diseases*; 2011. Disponível em http://www.uic.edu/classes/bioe/bioe595/AMPs/NanoSciTech/11.Nanotechnology_of_Alzheimers_disease_detection_and_treatment.pdf e consultado a 8 de julho de 2013.
5. ALIVISATOS, A.; et al.; Nanotools for Neuroscience and Brain Activity Mapping; *American Chemical Society*; março 2013. Disponível em <http://papers.cnl.salk.edu/PDFs/Nanotools%20for%20Neuroscience%20and%20Brain%20Activity%20Mapping%202013-4332.pdf> e consultado a 16 de junho de 2013.
6. GANDHI, M.; et al.; Nanotechnology in Blood Brain Barrier: A Review; *IJPBA*; março 2010. Disponível em www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/14/3&sa=X&scisig=AAGBfm2jGJ9tm6NVClkzulU5r0wCGI2TSQ&oi=scholar&ei=RNL6UYiOLKQ7Aan7oCYCg&ved=0CCwQgAMoADAA e consultado a 12 de junho de 2013.
7. SHARMA, H.; *New Perspectives of Central Nervous System Injury and Neuroprotection*; Volume 112; 2012. Disponível em http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=TNrAwTsS1IsC&oi=fnd&pg=PA47&dq=nanodrugs+in+alzheimer&ots=osH8-Rcpwl&sig=5PFLShnTVxIrbCEGTXzIPdKViuY&redir_esc=y#v=onepage&q=nanodrugs%20in%20alzheimer&f=false e consultado a 20 de abril de 2013.
8. NUNES, A.; JAMAL, K.; et al; Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system; *Journal of Controlled Release*; abril 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512901> e consultado a 4 de março de 2013.

9. Successful nanotechnology research, Outstanding science and technology to match the needs of future society; European Commission; 2011. Disponível em http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/successful-eu-nanotech-research_en.pdf e consultado a 23 de fevereiro de 2013.
10. KUMAR, Challa; Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D; 2010. Disponível em http://www.researchgate.net/publication/222638393_Nanotechnology_tools_in_pharmaceutical_RD e consultado em 12 março de 2013.
11. SADRIEH, N.; Overview of CDER Experience with Nanotechnology-related Drugs; FDA; agosto 2012. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads> e consultado a 11 de fevereiro de 2013.
12. Committee on Social Affairs, Health and Sustainable Development; Nanotechnology: balancing benefits and risks to public health and the environment; Parliamentary Assembly; janeiro 2013. Disponível em http://www.assembly.coe.int/Communication/Asocdoc27rev_2012.pdf e consultado a 5 de julho de 2013.
13. RE, F.; GREGORI, M.; MASSERINI, M.; Nanotechnology for neurodegenerative disorders; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine; 2012. Disponível em [http://www.maturitas.org/article/S0378-5122\(11\)00444-0/abstract](http://www.maturitas.org/article/S0378-5122(11)00444-0/abstract) e consultado a 4 de julho de 2013.
14. MASSERINI, M.; Nanoparticles for Brain Drug Delivery; ISRN Biochemistry; 2013. Disponível em <http://www.hindawi.com/isrn/biochemistry/2013/238428/cta/> e consultado a 15 de junho de 2013.
15. Nanomedicine, Nanotechnology for life; European Technology Platform – Strategic Research Agenda for Nanomedicine; novembro 2006. Disponível em <http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/strategic-research-agenda> e consultado a 15 junho de 2013.
16. GABATHULER, R.; Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases; Neurobiology of Disease; 48-57; 2010. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664710> e consultado a 17 de junho de 2013.
17. WEPEREN, W. e GAILLARD, P.; Enhanced Drug Delivery to the Brain: Safe and Versatile; Delivery Systems; 2011. Disponível em <http://www.ondrugdelivery.com/publications/Injectable%20Formulations%202011/to-BBB.pdf> e consultado a 20 junho de 2013.
18. BOKARA, K.; et al.; Biocompatibility of carbon nanotubes with stem cells to treat CNS injuries; Anatomy & Cell Biology; 12 junho de 2013. Disponível em

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713283/> e consultado em 3 de julho de 2013.
19. VALDIGLESIAS, V.; et al.; Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells; *Food and Chemical Toxicology*; 15 de abril de 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23597443> e consultado a 18 de junho de 2013.
 20. VALDIGLESIAS, V.; et al.; Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles; *Environment International*; março 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535050> e consultado a 5 de julho de 2013.
 21. CHUNG, C.; YANG, J.; KUO, Y.; Polybutylcyanoacrylate nanoparticle-mediated neurotrophin-3 gene delivery for differentiating iPS cells into neurons; *Biomaterials*; abril 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623427> e consultado a 23 de maio de 2013.
 22. GROSSE, S.; EVJE, L.; SYVERSEN, T.; Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture; *Toxicology in Vitro*; agosto 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954533> e consultado a 20 de julho de 2013.
 23. WU, J.; DING, T.; SUN, J.; Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus; *NeuroToxicology*; setembro 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995439> e consultado a 30 de julho de 2013.
 24. CAMPOS, F.; RAMOS-CABRER, P.; Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets; *International Journal of Nanomedicine*; 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592553/> e consultado a 12 de maio de 2013.
 25. KIM, J.; et al.; Brain-targeted delivery of protein using chitosan and RVG peptide-conjugated pluronic-based nano-carrier; *Biomaterials*; novembro de 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122677> e consultado a 19 de junho de 2013.
 26. SHARMA, H.; Nanoneuroscience and nanoneuropharmacology; *Progress in Brain Research*; 2009. Disponível em <ftp://s208.math.msu.su/480000/ce98019c27700c6d330f7e190612581b> e consultado a 31 de julho de 2013.
 27. MALMO, J.; et al.; Nanoparticle Mediated P-Glycoprotein Silencing for Improved Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier: A siRNA-Chitosan Approach; *PLoS one*; janeiro 2013. Disponível em <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0054182> e consultado a 31 de julho de 2013.
 28. BRAMBILLA, D.; Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy and safety

- issues; Nanomedicine; 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477665> e consultado a 30 de julho de 2013.
29. DIKPATI, A.; et al.; Targeted Drug Delivery to CNS using Nanoparticles; JAPC; 2012; Disponível em <http://japsjournal.com/views.php?id=21> e consultado a 8 de junho de 2013.
30. CHEN, Y.; LIU, L.; Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier; Advanced Drug Delivery Reviews; 2012. Disponível em <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11002900> e consultado a 27 de abril de 2013.
31. MATHEW, A.; et al.; Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-I Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease; PLoS one, 2012. Disponível em <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0032616> e consultado a 31 de julho de 2013.
32. PAULA, A.; et al.; Suppression of the Hemolytic Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles after Protein Corona Interaction: Independence of the Surface Microchemical Environment; Sociedade Brasileira de Química; 1807-1814, 2012. Disponível em http://submission.jbcs.sbq.org.br/online/2012/vol23_n10/aop080_12.pdf e consultado a 31 de julho de 2013.
33. NAZEM, A.; MANSOORI, G.; Nanotechnology Solutions for Alzheimer's Disease: Advances in Research Tools, Diagnostic Methods and Therapeutic Agents; Journal of Alzheimer's Disease; 199-223; 2008. Disponível em http://www.uic.edu/labs/trl/1.OnlineMaterials/08-Nanotechnology_Solutions_for_Alzheimer's_Disease.pdf e consultado em 10 de junho 2013.
34. BABAEI, A.; TAHERI, A., FARAHANI, I.; Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode; Sensors and Actuators B: Chemical; abril de 2013. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400513003900> e consultado a 24 de junho de 2013.
35. QIAN, Y.; et al.; PEGylated poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)/ DNA polyplex micelles decorated with phage-displayed TGN peptide for brain-targeted gene delivery; Biomaterials; dezembro 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245924> e consultado a 2 de junho de 2013;
36. BATRAKOVA, E.; et al.; A macrophage-nanozyme delivery system for Parkinson's disease, Bioconjug. Chem. 18; 2007. Disponível em

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760417> e consultado a 26 de junho de 2013.
37. CROTTY, S.; et al.; Neuroprotective effects of novel phosphatidylglycerolbased phospholipids in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease; *Eur. J. Neurosci.* 27; 2008. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190522> e consultado a 24 de julho de 2013.
 38. GONZALEZ-BARRIOS, J.; et al.; Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats, *Mol. Ther.* 14; 2006. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015039> e consultado a 2 de junho de 2013.
 39. KURAKHMAEVA, K.; et al.; Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *J. Drug Target.* 17; 2009. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19694610> e consultado a 2 de junho de 2013.
 40. HU, K.; et al.; Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease, *Int. J. Pharm.* 415; 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21651967> e consultado a 2 de junho de 2013.
 41. BEZEM, M.; Stabilisation of Tyrosine Hydroxylase in Nanoparticles for Enzyme Replacement Therapy; University of Bergen; fevereiro 2012. Disponível em <https://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/5773/93836853.pdf?...1> consultado em 17 de junho de 2013.
 42. WEN, Z.; et al.; Odorranalectin-conjugated nanoparticles: preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration, *J. Control. Release* 151; 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362449> e consultado a 3 de junho de 2013.
 43. RZIGALINSKI, B.; Cerium Oxide Nanoparticles in Treatment of Parkinson's Disease; The Michael J. Fox Foundation; 2009. Disponível em https://www.michaeljfox.org/foundation/grant-detail.php?grant_id=585 e consultado a 29 de julho de 2013.
 44. TSAI, M.; et al.; Oral apomorphine delivery from solid lipid nanoparticles with different monostearate emulsifiers: pharmacokinetic and behavioral evaluations, *J. Pharm. Sci.* 100; 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20740670> e consultado a 3 de junho de 2013.
 45. Targeted drug delivery; *Journal of Controlled Release*; 148; 2010. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910005663> e consultado a 17 de julho de 2013.

46. HERRÁN, E.; et al.; VEGF-releasing biodegradable nanosphere administered by craniotomy: A novel therapeutic approach in the APP/PsI mouse model of Alzheimer's disease; Elsevier; 16 de maio de 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684689> e consultado a 20 de julho de 2013.
47. RAY, B.; et al.; Neuroprotective and neurorescue Effects of a novel Polymeric Nanoparticle Formulation of Curcumin (NanoCurc™) in the neuronal cell culture and Animal Model: Implications for Alzheimer's disease; Journal of Alzheimer's Disease (23); 2011. Disponível em <http://iospress.metapress.com/content/h461626645124626/fulltext.pdf> e consultado a 1 de agosto de 2013.
48. ISMAIL, M.; EIMESHAD, A.; SALEM, N.; Potential therapeutic effect of nanobased formulation of rivastigmine on rat model of Alzheimer's disease; International Journal of Nanomedicine; janeiro 2013. Disponível em http://www.dovepress.com/articles.php?article_id=12045 e consultado a 17 de julho de 2013.
49. BERNARDI, A.; et al.; Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models; International Journal of Nanomedicine; setembro 2012. Disponível em http://www.dovepress.com/articles.php?article_id=10991 e consultado a 31 de julho de 2013.
50. BASSO, A.; et al.; Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis, J. Clin. Invest. 118; 2008. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340379> e consultado a 3 de junho de 2013.
51. YANG, Z.; et al.; Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease, Nanomedicine 6; 2010. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056170> e consultado a 3 de junho de 2013.
52. MAINE, E.; LUBIK, S.; GARNSEY, E.; Process-based vs. product-based innovation: Value creation by nanotech ventures; Technovation; 2012. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166497211001477> e consultado a 17 de julho de 2013.