

Aplicações da nanotecnologia em doenças do foro neurológico: vantagens e desafios

Nanotechnology applications in forum neurological diseases: benefits and challenges

Alexandra Miranda¹, Ana Rita Ramalho Figueiras^{1*}

¹Faculdade de Farmácia, Pólo das Ciências da Saúde, Universidade de Coimbra, Portugal

*rfigueiras@ff.uc.pt

RESUMO

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

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central; Barreira Hematoencefálica; Micelas Poliméricas; Sistema de Liberação de Drogas.

ABSTRACT

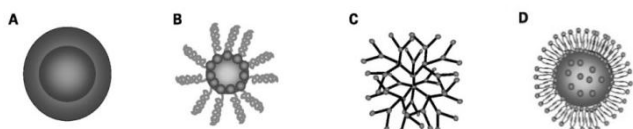
The incidence and prevalence of neurological disorders has been increasing with life expectancy. The development of therapeutic strategies to drug delivery in the central nervous system (CNS) has been a constant challenge due to the weak permeability of the Blood-Brain Barrier (BBB). In this regard,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

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

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que tem ganhado interesse nos últimos anos, principalmente na área médica, farmacêutica e química, apesar deste conceito já ter sido introduzido há mais de 40 anos (NATH & BANERJEE, 2013). Esta ciência permite a manipulação da matéria à escala atômica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos à escala nanométrica, com dimensões que variam, geralmente, entre 1-100 nm. No domínio médico-farmacêutico, a nanotecnologia aborda, sobretudo a caracterização, manipulação, preparação e aplicação de estruturas biológicas, especialmente as nanopartículas referidas no presente trabalho (OCHEKPE; OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2008) (Figura 1).

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



Fonte: CHO et al., 2008.

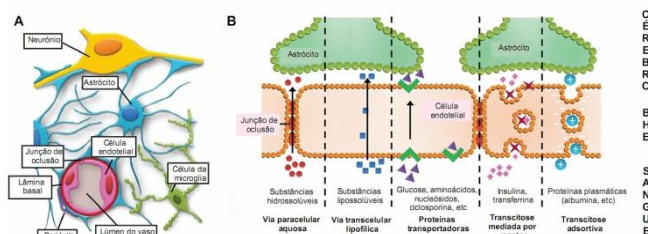
A nanotecnologia tem sido amplamente aplicada, principalmente na área dos *Drug Delivery Systems* (DDS), uma vez que as nanopartículas são capazes de interagir com sistemas biológicos a um nível molecular, podendo estimular, responder e interagir com as células-alvo e tecidos para induzir respostas fisiológicas desejadas (MODI, PILLAY & CHOONARA, 2010). Desta forma, a nanotecnologia tem sido utilizada a nível terapêutico para diversas patologias, e ainda a nível de diagnóstico e imagem, sendo que a aplicação mais promissora atualmente passa pelo transporte de nanosistemas através da barreira hematoencefálica (BHE) (KREUTER, 2007).

A incidência de doenças neurológicas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e glioblastoma, cresce rapidamente com o aumento significativo da expectativa de vida. No entanto, as intervenções tendo como alvo terapêutico o sistema nervoso central (SNC) continuam a ser um desafio, devido à dificuldade que os fármacos apresentam em atingir o cérebro (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013). O SNC é

um sistema complexo e vulnerável, protegido por uma barreira biológica, a BHE, que constitui um ótimo mecanismo de defesa do cérebro contra moléculas externas que possam provocar qualquer tipo de dano cerebral, sendo por isso bastante seletiva na passagem de moléculas entre a corrente sanguínea e o cérebro (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013). Porém, este mecanismo defensivo complica as tentativas de se realizar estratégias terapêuticas com o objetivo de se alcançar o cérebro e de exercerem as suas ações farmacológicas em alvos neurológicos.

A BHE é formada por uma monocamada de células endoteliais ligadas umas às outras através das junções de oclusão, tendo contato direto ou indireto com os terminais dos astrócitos, neurônios perivascularres e periócitos (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013) (Figura 2A). As células endoteliais do cérebro são altamente polarizadas e apresentam baixa atividade pinocítica, no entanto contêm diferentes mecanismos de transporte ativo para garantir a homeostase do cérebro; além disso, também possuem grandes concentrações de glicoproteína-P, que é uma proteína dependente de ATP, responsável pelo transporte ativo envolvido no efluxo de múltiplos fármacos, incluindo os quimioterápicos (NEHA, GANESH & PREETI, 2013) (Figura 2B).

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



Fonte: RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013.

As nanopartículas, devido ao seu tamanho reduzido, têm sido consideradas como possíveis estratégias terapêuticas para atravessarem a BHE e atingir o cérebro. No entanto, a modificação das suas estruturas tem se tornado essencial para aumentar a especificidade e seletividade, promovendo assim uma libertação mais eficaz e direcionada dos fármacos nos tecidos alvo. Uma

das modificações mais comuns é a funcionalização ou a adição de ligantes à superfície das nanopartículas para que possam interagir diretamente com as células endoteliais, como é o caso da transferrina, insulina e tiamina, que têm receptores específicos na BHE (TOSI, RUOZI & BELLETTI, 2017). Investigadores verificaram que, desta interação entre as nanopartículas com ligantes e os receptores correspondentes, criam-se vesículas endocíticas que promovem a transcitose através das células da BHE, levando por fim à liberação das nanopartículas no cérebro por exocitose (TOSI, RUOZI & BELLETTI, 2017).

O presente trabalho tem como principal objetivo fazer uma abordagem dos principais sistemas nanoparticulados que se consideram promissores no transporte de fármacos até o cérebro. Focando nas principais características de cada um deles e valorizando o que a nanotecnologia pode proporcionar na melhoria do tratamento e prevenção de diferentes patologias do foro neurológico.

Novas estratégias de diagnóstico e terapêutica em doenças neurológicas

Atualmente existem vários tipos de nanosistemas com potencial para transportar, de forma específica, fármacos ou outras moléculas até o cérebro (MODI, PILLAY & CHOONARA, 2010). Esses nanosistemas são desenvolvidos à escala nanométrica (abaixo de 1 µm), podendo ser constituídos por diferentes materiais biodegradáveis tais como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios (como por exemplo fosfolipídios) e compostos organometálicos (RAWAT et al., 2006).

De um modo geral, as nanopartículas são consideradas veículos excelentes para o transporte e libertação de fármacos devido às inúmeras vantagens que apresentam (RAWAT et al., 2006).

Entre estas destacam-se:

a) A elevada estabilidade química e biológica, bem como a ausência de toxicidade e de imunogenicidade;

d) A maior eficácia terapêutica, no sentido em que promovem um aumento da solubilidade dos fármacos, a proteção dos mesmos à degradação enzimática e uma alteração do seu perfil farmacocinético e do perfil de administração: favorecendo uma maior distribuição, especificidade e libertação constante e controlada dos fármacos, diminuindo consequentemente a dose administrada;

e) A capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, como fármacos, siRNA, DNA e proteínas, minimizando assim os efeitos secundários associados ao fármaco livre, e portanto a sua citotoxicidade;

f) A capacidade de administração por diferentes vias, tais como oral, inalatória ou parenteral, assim como o aumento da especificidade para atingir determinados alvos biológicos;

h) O tamanho reduzido, que lhes permite chegar a áreas profundas do organismo e ultrapassar diferentes estruturas anatómicas, tais como a BHE;

i) A facilidade de manipulação quer do tamanho, quer da sua composição (RAWAT et al., 2006; OCHEKPE; OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2009; MASSERINI, 2013).

Embora todas estas vantagens sejam significativas, existem também algumas limitações que devem ser levadas em consideração no desenvolvimento destes sistemas. A possível toxicidade dos produtos resultantes da sua degradação, a incompatibilidade biológica dos materiais utilizados, os custos mais elevados (dependendo do material e do processo de obtenção) comparativamente às formulações farmacêuticas convencionais e o baixo tempo de circulação na corrente sanguínea devido ao rápido *uptake* por parte do sistema reticuloendotelial (RES), proporcionam desafios constantes à ciência no sentido de se tentar alcançar estratégias para ultrapassar as limitações evidenciadas e melhorar as suas características menos apropriadas (VERMA & GARG, 2001; CHO et al., 2008).

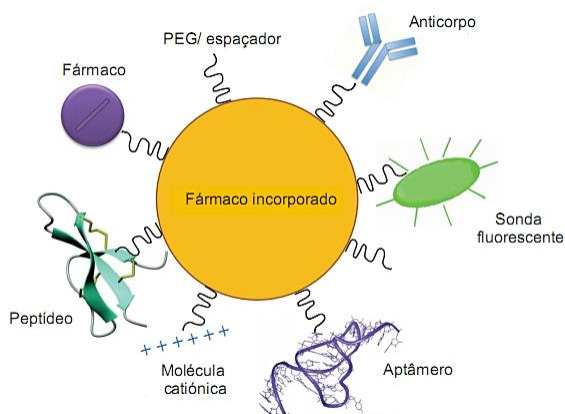
Para controlar as propriedades das nanopartículas *in vivo*, são efetuadas, frequentemente, modificações nas suas estruturas (TORCHILIN, 2009). Esta manipulação permite ajustar as suas características de acordo com o local patológico onde vão atuar e consoante a sua finalidade, ou seja, diagnóstico ou terapêutica, tendo os seguintes objetivos:

l) Aumentar a estabilidade e o tempo de circulação das nanopartículas na corrente sanguínea (TORCHILIN, 2009) – A PEGuilação é uma das estratégias mais utilizadas neste sentido. Modificar a estrutura das nanopartículas com a adição do polímero sintético Polietilenoglicol (PEG) resulta na formação de uma camada polimérica à superfície da nanopartícula que é impermeável para outros solutos, mesmo em concentrações relativamente baixas de polímero (TORCHILIN, 2009). Por outro lado, o PEG impede a interação e ligação dos componentes do sangue com a superfície da nanopartícula através de

repulsões estéricas, prevenindo a opsonização da nanopartícula e a sua captura pelo RES, que não é mais do que um sistema mononuclear fagocitário constituído por um diverso grupo de células localizadas em diferentes tecidos do organismo. Esta estratégia permite à nanopartícula circular por mais tempo na corrente sanguínea sem ser reconhecida, evitando assim a sua rápida *clearance* por parte do organismo (HUSSEINI & PITT, 2008; MORSHED et al., 2013).

II) Direcionar as nanopartículas para o tecido patológico alvo, através da incorporação de ligantes à superfície das mesmas, que apresentam seletividade para determinados receptores ou moléculas de superfície das células alvo (TORCHILIN, 2009). Estes ligantes permitem controlar a biodistribuição da nanopartícula e a sua captação específica pelas células no local ativo, podendo ser açúcares, peptídeos, proteínas, aptâmeros, anticorpos monoclonais, entre outros, como demonstrado a Figura 3 (MOURYA et al., 2011). Existem, no entanto, alguns problemas que devem ser considerados na concepção destes sistemas: o ligando à superfície da nanopartícula pode aumentar o *uptake* pelo RES, apesar de estar protegido estericamente; pode facilitar o desenvolvimento de uma resposta imunitária indesejável, dependendo do tipo de ligante e da composição da nanopartícula; a quantidade de ligante pode tornar-se um fator crítico para assegurar o êxito da ligação ao alvo, mantendo uma circulação prolongada da nanopartícula na corrente sanguínea (TORCHILIN, 2009).

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



Fonte: MASSERINI, 2013.

III) Conferir às nanopartículas sensibilidade a determinados estímulos intrinsecamente característicos da área patológica, como a temperatura e pH, ou estímulos externos aplicados nessa mesma área, como a ultrassonografia (MOURYA et al., 2010). Dependendo do estímulo, diferentes respostas podem ser observadas, como a rutura da estrutura da nanopartícula e alterações da sua forma, volume, taxa de permeação, estado de hidratação e alterações de estados conformacionais (MOURYA et al., 2011). Esta estratégia permite que a libertação dos fármacos a partir das nanopartículas se torne dependente das características fisiológicas exclusivas dos tecidos patológicos, e que, portanto, não são verificadas em tecidos saudáveis (MOURYA et al., 2011). Neste sentido, os chamados polímeros inteligentes, ou polímeros *stimule-responsive*, têm sido amplamente utilizados na preparação das nanopartículas, uma vez que apresentam uma resposta ativa a pequenos sinais e alterações do ambiente circundante, sofrendo alterações drásticas na sua microestrutura que conduzem a modificações desejáveis nas suas propriedades físico-químicas, sendo estas transições reversíveis (ZHANG, WARDWELL & BADER, 2013).

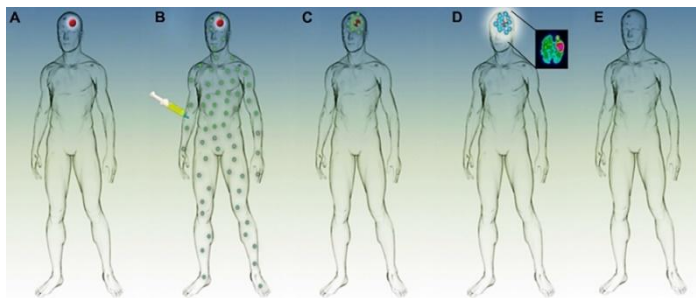
Este mecanismo tem apresentado especial relevância na terapêutica antineoplásica. Nesta situação, as nanopartículas têm de passar da corrente sanguínea para o interstício tumoral e, em muitos casos, têm de entrar nos endossomas. No entanto, cada compartimento tem o seu próprio pH: o pH do sistema endossomal (entre 5,0 e 6,0) é substancialmente menor do que o pH fisiológico (pH 7,4) e o pH extracelular de tumores sólidos (isto é, 6,8) (PROVENZALE & SILVA, 2009). Aparentemente estas variações de pH causariam instabilidade na nanopartícula e inclusive afetariam o seu transporte ao longo da corrente sanguínea até chegar ao alvo terapêutico. Nesse contexto, estudos já realizados demonstraram que um revestimento da nanopartícula com PEG é reversivelmente removido a pH de 6,8 e reconstituído a pH 7,4. É de salientar que uma nanopartícula desta natureza pode ser alterada para fornecer informações sobre o pH de um determinado compartimento biológico, o que poderá ser importante em vários aspetos, tais como a compreensão da resistência aos medicamentos para agentes quimioterápicos que são sensíveis ao pH (PROVENZALE & SILVA, 2009). Um outro exemplo diz respeito à ocorrência de isquemia cerebral após uma acidose láctica, em que o pH

diminui drasticamente, sendo este tipo de nanopartículas uma boa estratégia para alcançar a zona afetada e poder atuar de forma eficiente (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013).

IV) Adicionar agentes de contraste às nanopartículas, fornecendo informação visual em tempo real sobre a sua distribuição e acumulação no tecido alvo (TORCHILIN, 2009). Esta estratégia, conhecida como teranóstico, é bastante promissora no sentido em que faz uso das nanopartículas para construir uma plataforma de tratamento que combina um diagnóstico *in situ*, através de imagiologia, com uma terapia específica, através da encapsulação de fármaco e com a monitorização da resposta a essa terapia (TORCHILIN, 2009). Os agentes de contraste mais comumente utilizados são as partículas de óxido de ferro e quelatos de gadolínio, enquanto que os nanossistemas com maior sucesso no teranóstico são as micelas, os lipossomas e mais recentemente os dendrímeros (TORCHILIN, 2009; RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013).

A maioria dos distúrbios neurológicos é focal e por isso só afeta um determinado órgão, tecido ou até mesmo uma só linhagem celular específica, como por exemplo os neurônios dopaminérgicos da substância negra na doença de Parkinson (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013). Desta forma, o teranóstico baseia-se no seguinte: administração sistêmica das nanopartículas que se distribuem pelo organismo; a sua capacidade de alcançar o local da patologia, através de modificações estratégicas na sua estrutura, e facilidade em concentrar o fármaco no local desejado; uso das tecnologias de imagem, como a ressonância magnética de imagem ou tomografia, para visualizar o percurso das nanopartículas no organismo, bem como localizar, delinear e quantificar a zona lesada e monitorizar a progressão da patologia em resposta ao tratamento (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013) (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo do conceito de teranóstico.



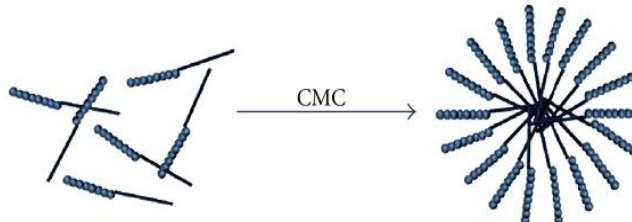
Fonte:RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013.

Micelas Poliméricas

Nos últimos anos, as micelas poliméricas (MP) têm surgido como *Drug Delivery Systems* (DDS) promissores, com principal destaque na área de oncologia, devido à sua estrutura tão peculiar, tendo uma aplicação vasta no transporte de proteínas, material genético e fármacos hidrofóbicos (FRANCIS, CRISTEA & WINNIK, 2004).

Estas nanopartículas são obtidas a partir de copolímeros anfífilicos em bloco, que se agregam espontaneamente em meio aquoso acima de uma certa concentração, designada por Concentração Micelar Crítica (CMC), formando-se assim uma estrutura esférica com um núcleo interior hidrofóbico rodeado por uma camada exterior hidrofílica, e com um diâmetro compreendido entre 10-100nm (HUSSEINI & PITT, 2008; MOURYA et al., 2011 (Figura 5). Este processo de micelização é influenciado por vários fatores, entre os quais o tamanho da porção hidrofóbica, a concentração dos compostos anfífilicos, a temperatura e a solução envolvente. Por outro lado, o tamanho da micela formada depende do peso molecular dos copolímeros anfífilicos, do número de agregados formados entre eles, da proporção entre o número de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, bem como do processo de preparação (MOURYA et al., 2011). As interações hidrofóbicas são as principais forças responsáveis pela formação das micelas. No entanto, outras forças intermoleculares como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas também estão presentes, de modo a promover uma maior estabilidade da estrutura (MORSHED et al., 2013).

Figura 5. Processo de formação de micelas



Fonte:ANDRADE et al., 2011.

O núcleo hidrofóbico das MP apresenta elevada capacidade para encapsular fármacos hidrofóbicos (até 20-30% do peso da nanopartícula) através de ligações covalentes aos copolímeros ou por incorporação física no interior do núcleo, aumentando a solubilidade aquosa dos mesmos (SINGH et al., 2012; HUSSEINI & PITT, 2008); por outro lado, o exterior hidrofílico serve como interface estabilizante entre o núcleo

hidrofóbico e o meio externo aquoso devido às forças repulsivas que exerce (MOURYA et al., 2010; SINGH et al., 2012). Assim sendo, as MP são sistemas com elevado potencial para transportar fármacos que apresentam fraca solubilidade em água, melhorando a biodisponibilidade oral bem como a farmacocinética desses fármacos no organismo (MOURYA et al., 2010).

Ao contrário das micelas surfactantes convencionais, as MP apresentam baixo valor de CMC e também ligações covalentes entre os monômeros que constituem o núcleo hidrofóbico, evitando assim trocas dinâmicas de monômeros entre a solução livre e a pseudo-fasemcelar, conferindo desta forma rigidez e estabilidade à micela em meio aquoso (MOURYA et al., 2011; MORSHED et al., 2013). Além disso, também não apresentam citotoxicidade e permitem a conjugação com uma multiplicidade de grupos funcionais que oferecem vantagens terapêuticas (FRANCIS, CRISTEA & WINNIK, 2004).

Vários copolímeros têm sido utilizados na formação de micelas. No entanto, o fato de haver a necessidade da presença de características biodegradáveis e biocompatíveis nas nanopartículas para aplicação clínica tem limitado a escolha dos copolímeros (SUTTON, NASONGKLA & BLANCO, 2007). Para o segmento hidrofóbico, o mais comum é a utilização de derivados de poliésteres, poliéteres e de polipeptídeos. Os poliésteres, como o ácido poliláctico (PLA), a poli(caprolactona) (PCL), o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) e o ácido poliglicólico (PGA) apresentam a vantagem de estarem aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações biomédicas. Por outro lado, o polietilenoglicol (PEG) é utilizado como segmento hidrofílico na maioria das MP, uma vez que não possui imunogenicidade nem toxicidade, além da vantagem já acima mencionada relativamente à capacidade de aumentar o tempo de circulação da MP na corrente sanguínea (HUSSEINI & PITT, 2008; MORSHED et al., 2013).

Os polímeros acima mencionados podem apresentar-se sob a forma de di-blocos, tri-blocos ou estruturas ainda mais complexas. Dentre os materiais anfifílicos mais utilizados atualmente, encontram-se os copolímeros hidrofílicos derivados de óxido de polietileno (PEO) e os derivados hidrofóbicos de óxido de polipropileno (PPO), dando especial destaque ao Pluronic[®], que é caracterizado por apresentar uma linear e bifuncional tricamada PEO-PPO-PEO. Estudos já realizados demonstraram que o uso de Pluronic[®]

pode ser vantajoso em situações oncológicas, uma vez que em baixas concentrações tem a capacidade de contrariar as múltiplas resistências a fármacos desenvolvidas pelas células cancerígenas que estiveram expostas repetidamente a agentes quimioterápicos (HUSSEINI & PITT, 2008).

Além das inúmeras vantagens já mencionadas relativamente às nanopartículas em geral, e que portanto também se adequam às MP, estas últimas apresentam também algumas particularidades. A preparação das MP é realizada facilmente em grandes quantidades e de forma reprodutível, além da flexibilidade na modificação da morfologia, permitindo facilmente um ajuste da estrutura dos copolímeros anfifílicos quando necessário (FRANCIS, CRISTEA & WINNIK, 2004; MOURYA et al., 2011).

Como limitações, as MP apresentam alguma instabilidade devido à sua estrutura reversível composta por ligações não covalentes, além do fato de só demonstrarem vantagem no transporte de fármacos hidrofóbicos. Por outro lado, as MP, tal como grande parte das nanopartículas, estão sujeitas a uma rápida *clearance*, que pode ser minimizada pela adição de PEG à sua estrutura (HUSSEINI & PITT, 2008). No entanto, é a sua baixa toxicidade e a rápida taxa de *clearance* que as tornam adequadas para transportar fármacos por via intravenosa (MOURYA et al., 2011).

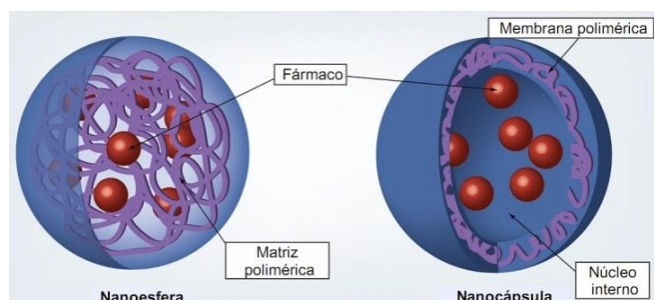
Nanopartículas Poliméricas

Desenvolvidas na década de 90, as nanopartículas poliméricas (NP) têm ganhado importância não só pela capacidade de transportar fármacos em geral, mas porque têm sido consideradas transportadores promissores para o sistema nervoso central (SNC) (NEHA, GANESH & PREETI, 2013). As NP são sistemas coloidais com um tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm (geralmente 200 nm), sendo compostas por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos (RAWAT et al., 2006; NEHA, GANESH & PREETI, 2013).

Nanopartículas poliméricas é uma expressão coletiva que engloba dois tipos de estruturas diferentes, nomeadamente nanocápsulas e nanoesferas, que diferem entre si na composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas densas onde o fármaco é disperso uniformemente, sendo depois liberto por difusão. Por outro lado, as nanocápsulas constituem

sistemas reservatório com um núcleo líquido diferenciado, geralmente oleoso e onde o fármaco é dissolvido, sendo esse núcleo envolvido por uma fina membrana polimérica (MODI, PILLAY & CHOONARA, 2010; STEICHEN, CALDORERA-MOORE & PEPPAS, 2013) (Figura 6). As vantagens das nanocápsulas relativamente às nanoesferas devem-se ao fato das nanocápsulas terem a capacidade de incorporar fármacos na forma líquida ou sólida, como uma dispersão molecular; o baixo conteúdo de polímeros, diminuindo possíveis toxicidades; e a maior capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos, devido ao seu núcleo lipofílico (BLOUZA et al., 2006).

Figura 6. Ilustração dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: nanoesferas e nanocápsulas.



Fonte: STEICHEN, CALDORERA-MOORE & PEPPAS, 2013

A libertação do fármaco por parte das NP é influenciada quer pelas propriedades do polímero utilizado (relativamente ao seu perfil de biodegradação, distribuição da massa molecular e hidrofobicidade), quer pelas próprias propriedades do fármaco (RIEUX et al., 2006). Assim sendo, com o objetivo de se alcançar uma libertação controlada de fármaco, o uso de polímeros naturais convencionais, como quitosana, celulose, alginato de sódio e colágeno, têm vindo a ser substituído por polímeros sintéticos, igualmente biodegradáveis, como PLA, PGA, PCL e PLGA (NEHA, GANESH & PREETI, 2013). A seleção do polímero torna-se então um fator decisivo, uma vez que os polímeros naturais proporcionam uma libertação relativamente rápida do fármaco a partir da NP, pois decompõem-se em poucas horas, enquanto que os polímeros sintéticos favorecem uma libertação mais prolongada do fármaco, pois resistem à degradação pelo organismo durante dias ou até mesmo semanas (RIEUX et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Desta forma, é possível controlar as propriedades das NP através da sua composição, como o tipo de polímero usado, o respetivo peso molecular e a proporção fármaco-polímero, bem

como dos grupos funcionais terminais que lhes são adicionados à estrutura para conferir determinada especificidade (DIKPATI et al., 2012). Por outro lado, vários fatores podem influenciar a estabilidade das NP, e como tal a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores das nanopartículas, sob diferentes condições de armazenamento, é fundamental. Além disso, também o potencial zeta, o teor de fármaco, o tamanho de partícula, a distribuição da massa molar e o pH são parâmetros físico-químicos que devem ser tidos em conta na monitorização da estabilidade (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A preparação das NP pode ser realizada por diferentes métodos. De uma forma geral, estes podem ser classificados em duas categorias, dependendo se as nanopartículas são preparadas diretamente a partir de reações de polimerização *in situ* de monómeros dispersos ou se a partir da precipitação de polímeros, sintéticos ou naturais, pré-formados (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). A preparação requer sempre a utilização de um polímero, de um ou vários solventes, de um não-solvente, de um ou mais tensoativos e de um óleo no caso de se tratar de nanocápsulas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Além das vantagens gerais das nanopartículas, as NP destacam-se pela maior facilidade na modificação da sua estrutura e por apresentarem maior estabilidade nos fluidos gastrointestinais, quando administrada por via oral, quando comparada às micelas e lipossomas. Isto deve-se ao fato das NP possuírem fortes interações moleculares, como ligações covalentes, que tornam a estrutura mais rígida e estável (RAMOS-CABRER & CAMPOS, 2013). Adicionalmente, destacam-se pela capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos ou fármacos hidrofóbicos, o que não acontece nas micelas poliméricas. As NP possuem grande capacidade de incorporação de fármaco, sendo preparadas em grandes quantidades e por uma grande variedade de métodos (NEHA, GANESH & PREETI, 2013).

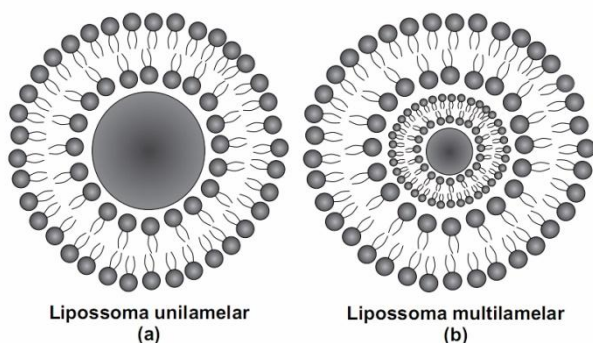
A maior desvantagem das NP é o já conhecido *uptake* por parte do RES, levando a uma falência da terapêutica devido à concentração insuficiente de fármaco presente no sangue e que passa através da BHE. No entanto, o uso de PEG, surfactantes, como o polissorbato 80 (Tween 80[®]) e ligantes à sua superfície, podem contribuir para ultrapassar esta limitação (NEHA, GANESH & PREETI, 2013).

Lipossomas

Os lipossomas foram desenvolvidos nos anos 60 e, portanto constituem a primeira geração de nanossistemas para DDS (MASSERINI, 2013). No entanto, a sua estrutura não estagnou e vários estudos têm sido responsáveis pela evolução deste tipo de sistemas, dando origem aos mais recentes lipossomas catiônicos, imunolipossomas, virossomas, entre outros (SPUCH & NAVARRO, 2011).

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas que delimitam um compartimento interno aquoso, fazendo variar o seu tamanho entre nanômetros e micrômetros de diâmetro (MASSERINI, 2013). Desta forma, estes nanossistemas podem ser classificados em três tipos: vesículas unilamelares pequenas (SUVs), quando possuem uma única bicamada lipídica e um tamanho entre 25-100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUVs), quando possuem uma única bicamada lipídica e um tamanho entre 200-800 nm; vesículas multilamelares (MLVs), quando possuem múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas, num máximo de catorze bicamadas, com um tamanho entre 500-5000 nm (SPUCH & NAVARRO, 2011) (Figura 7).

Figura 7. Ilustração de um lipossoma unilamelar e multilamelar.



Fonte: SPUCH & NAVARRO, 2011.

Devido a esta composição anfifílica, os lipossomas podem encapsular quer fármacos hidrofílicos, quer hidrofóbicos; os primeiros são incorporados no núcleo interno aquoso enquanto que os segundos ficam inseridos ou adsorvidos nas bicamadas lipídicas (SHARMA & SHARMA, 1997). No entanto, o tamanho, o número de bicamadas lipídicas e a proporção de concentrações lipídios-fármaco são fatores importantes que influenciam a eficiência da encapsulação dos fármacos nos lipossomas (SHARMA & SHARMA, 1997; SPUCH & NAVARRO, 2011). No caso dos fármacos hidrofílicos, a percentagem da sua encapsulação depende da composição da bicamada lipídica e do

método de preparação do lipossoma (SPUCH & NAVARRO, 2011). Por outro lado, o tamanho da vesícula é um fator crítico na determinação do seu tempo de meia-vida e no transporte de moléculas, sendo que as MLVs são as primeiras a serem eliminadas da circulação sanguínea devido à fagocitose (SPUCH & NAVARRO, 2011; CHAPMAN & PASCU, 2012).

Os lipossomas podem ser constituídos por diferentes tipos de lipídios. Contudo, os fosfolipídios são os mais utilizados, como a fosfatidilcolina, extraída da gema de ovo ou da soja, a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol e a esfingomiéline (BATISTA, CARVALHO & MAGALHÃES, 2007; CHAPMAN & PASCU, 2012). A formação dos lipossomas ocorre espontaneamente quando os fosfolipídios entram em contato com um meio aquoso, devido à interação hidrofílica da cabeça polar do fosfolipídio com a água, levando assim à formação de estruturas unilamelares e multilamelares (VEMURI & RHODES, 1995; CHAPMAN & PASCU, 2012).

O colesterol, um importante componente da membrana celular, é frequentemente incluído nas formulações de lipossomas com o objetivo de aumentar a estabilidade das mesmas (MASSERINI, 2013). Assim, este esteroide favorece uma melhor fluidez da bicamada lipídica, reduz a permeabilidade dessa bicamada e ainda estabiliza-a na presença de fluidos biológicos (VEMURI & RHODES, 1995).

Associado às vantagens gerais das nanopartículas, os lipossomas destacam-se pela sua semelhança estrutural com as membranas celulares (bicamada lipídica com colesterol), facilitando uma interação profunda com as células do organismo, ou até mesmo com compartimentos celulares individuais. Por outro lado, a formulação exige baixo número de excipientes e, portanto a preparação torna-se simples (NEHA, GANESH & PREETI, 2013; VEMURI & RHODES, 1995).

Apesar dos lipossomas serem nanossistemas com características benéficas para o transporte de fármacos, também apresentam alguns inconvenientes, juntamente com o rápido *uptake* por parte do RES. Estes sistemas apresentam uma baixa eficiência de encapsulação de fármacos e uma elevada instabilidade no organismo, uma vez que são muito sensíveis ao pH e à temperatura. Esta limitação torna-se relevante nomeadamente na administração oral, tendo em conta que o baixo pH do estômago e a presença dos sais biliares desestabilizam a estrutura lipossômica (SPUCH & NAVARRO, 2011; CHAPMAN & PASCU, 2012).

Como já foi mencionado, os lipossomas

têm sofrido alterações estruturais nas últimas décadas de modo a acompanhar as necessidades terapêuticas. Primeiramente foram desenvolvidos os lipossomas com PEG. No entanto, após estudos terem revelado que essas estruturas eram capturadas de forma indiferenciada quer por células patológicas, quer por células saudáveis, surgiu a necessidade de desenvolver lipossomas com especificidade para determinados alvos terapêuticos (SPUCH & NAVARRO, 2011). Atualmente existem lipossomas que são considerados estratégias promissoras no transporte de fármacos; lipossomas catiônicos, no qual se cria uma forte afinidade entre a carga positiva dos lipídios do nanossistema com a carga negativa do material genético a transportar; imunolipossomas, que se baseiam na conjugação de anticorpos monoclonais à superfície do sistema; virossomas, em que se cria uma ligação entre um envelope viral e o lipossoma (MASSERINI, 2013; SPUCH & NAVARRO, 2011).

Dendrímeros

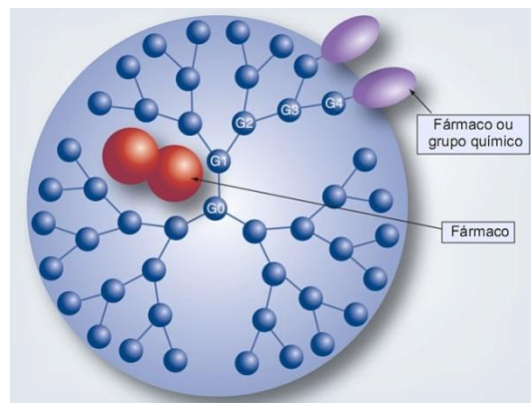
Apesar dos dendrímeros terem sido sintetizados pela primeira vez em 1978, sendo denominados como “moléculas-cascata”, o desenvolvimento desta classe de sistemas só ocorreu a partir de 1985 com a síntese dos conhecidos dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM), tendo hoje inúmeras aplicações na área do diagnóstico e da terapêutica (BOAS, CHRISTERSEN & HEEGAARD, 2006).

Os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares de 3-10 nm altamente ramificadas que se formam a partir de um átomo central, como o nitrogênio (NAGA ANUSHA & SIDDIQUI, 2011; BALAKRISHNAN et al., 2013). Em seguida, uma série de reações químicas ocorrem com a adição de carbono e de outros elementos, resultando em repetições de cadeias e ramificações que dão origem a camadas concêntricas radiais, sendo que cada ramificação possui uma disjunção binária (BOAS, CHRISTERSEN & HEEGAARD, 2006; MASSERINI, 2013; NAGA ANUSHA & SIDDIQUI, 2011) (Figura 8).

A superfície destas macromoléculas tridimensionais pode ser modificada pela introdução de grupos funcionais nos seus monômeros terminais, de modo a alterar as propriedades físico-químicas, como rigidez, reatividade química e solubilidade (NEWKOME, KOTTA & MOORFIELD, 2006). Portanto, a diversidade de estruturas dendríticas depende da escolha do grupo de superfície e do tipo de ligantes que são utilizados. Por cada camada de

unidades de ramificação, ou seja, por cada geração a mais no dendrímero, o número de grupos modificáveis à superfície duplica ou até triplica, enquanto o seu diâmetro apenas aumenta 1-2 nm (SARIN, et al., 2008).

Figura 8. Dendrímero de 4 gerações.



Fonte: BEI, MENG & YOUAN, 2010.

A síntese dos dendrímeros é realizada passo-a-passo, através de unidades ramificadas de polímero, podendo ser efetuada por dois métodos diferentes: um método divergente e um método convergente. No primeiro caso, o dendrímero é construído a partir de um centro, através da incorporação sequencial de monómeros no núcleo. No segundo caso, as ramificações são sintetizadas em primeiro lugar e só posteriormente é que são todas ligadas a um núcleo central. Contudo, a síntese divergente é a preferencial, uma vez que gera produtos mais puros e apresenta maior rendimento (LANGEREIS, et al., 2007; ESFAND & TOMALIA, 2001). Assim sendo, os dendrímeros mais comuns são compostos por derivados de poliamidas (PAMAM), poliésteres e polietilenoglicóis, tendo em conta que os principais grupos cliváveis são as amidas, ésteres e carbamatos (GINGRAS, RAIMUNDO & CHABRE, 2007). Através da escolha de diferentes polímeros, com diferentes grupos funcionais terminais, é possível controlar com precisão o tamanho do dendrímero, a forma, a dimensão, a polaridade, a flexibilidade e a solubilidade (LANGEREIS, et al., 2007).

Os dendrímeros, devido às inúmeras vantagens que apresentam, são excelentes candidatos ao transporte de fármacos, podendo o acoplamento ser feito de diferentes formas: o fármaco incorporado dentro da estrutura dendrítica, através de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio; os monômeros podem conter o fármaco, proporcionando um aumento exponencial do

fármaco a cada subsequente geração que é adicionada; interações com a estrutura ramificada através de espaçadores; e o fármaco ligado diretamente à superfície do dendrímero, através de interações eletrostáticas e covalentes (LIU & FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE & ATTWOOD, 2005; MASSERINI, 2013). Muitas vezes, os dendrímeros são conjugados à superfície com PEG, de modo a criar uma camada hidrofílica ao redor do dendrímero hidrofóbico, formando a chamada "micela unimolecular" capaz de transportar fármacos hidrofóbicos no interior e fármacos hidrofílicos na camada superficial de PEG (CRAMPTON & SIMANEK, 2007).

O processo de desintegração de um dendrímero-clivável, ou despolimerização, pode ocorrer de três formas: liberação do fármaco ou espécies químicas menores não ligadas covalentemente ao dendrímero; clivagem de ligações covalentes consecutivas com remoção inicial de grupos funcionais da periferia, seguida da quebra das ramificações (ou parte delas) até o núcleo; e um modo combinado em que a hidrólise de ligações covalentes da periferia é fundamental para a liberação das moléculas não ligadas covalentemente (D'EMANUELE & ATTWOOD, 2005; GINGRAS, RAIMUNDO & CHABRE, 2007).

Os dendrímeros são sem dúvida sistemas de última geração com grande potencial para transportar fármacos e agentes de contraste, pelas inúmeras vantagens que apresentam: arquitetura altamente ramificada e regular; baixa polidispersividade, o que facilita a sua passagem através de barreiras biológicas, como a BHE; grande número de funcionalidades periféricas; capacidade de fazer múltiplas cópias de grupos de superfície para um processo de reconhecimento biológico; facilidade na preparação; pequeno tamanho, quando comparado com micelas, nanopartículas poliméricas e lipossomas; e capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (SINGH, 2013) AKULA, 2013). No entanto, apresentam a mesma limitação que as outras partículas poliméricas, ou seja, a possibilidade de alguma toxicidade por parte dos polímeros utilizados (BOAS, CHRISTERSEN & HEEGAARD, 2006).

APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS EM ALVOS NEUROLÓGICOS

Doença de Alzheimer

O Alzheimer é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns. É uma doença

progressiva caracterizada pelo depósito da proteína β -amilóide no espaço existente entre os neurônios, formando placas senis. Por outro lado, há deposição da proteína Tau no interior dos neurônios, formando emaranhados neurofibrilares. Este quadro anátomo-patológico é responsável por uma demência e perda das funções cognitivas (AKULA, 2013).

I) Nanopartícula de PBCA revestida com Polissorbato 80 (Tween 80®) no transporte da Rivastigmina (ALYAUDIN et al., 2014)

As nanopartículas de poli(n-butilcianoacrilato) (PBCA) têm sido utilizadas no transporte de fármacos até o cérebro com elevado grau de sucesso, enquanto que o seu revestimento com Tween 80® já mostrou ser vantajoso na passagem através da BHE (DIKPATI et al., 2012).

Estudos já realizados revelaram que as nanopartículas PBCA revestidas com Tween 80® são eficazes no transporte da rivastigmina até à BHE, sendo este fármaco um inibidor reversível de colinesterases usado no tratamento da doença de Alzheimer. Quando as nanopartículas são administradas por via intravenosa, o Tween 80® promove uma adsorção das proteínas do plasma, especialmente a Apolipoproteína E (Apo E), à sua superfície. Este aspeto torna-se interessante ao perceber que as células endoteliais da BHE possuem recetores de LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade com afinidade para as Apo E, e, portanto as nanopartículas com Apo E à superfície podem ser reconhecidas e interagir com os recetores LDL da BHE, sendo responsáveis pelo *uptake* da rivastigmina no cérebro (BEGLEY et al., 2004; ALYAUDIN et al., 2014). É de notar que outros surfactantes podem servir de revestimento para as nanopartículas e inclusive promover igualmente a ligação de proteínas do plasma, no entanto, parece que apenas o Tween 80® absorve preferencialmente as Apo E (BEGLEY et al., 2004).

II) Lipossoma PE-PEG conjugado com Ácido Fosfatídico e Anticorpo Monoclonal R17217 (SALVATI et al., 2013).

Os lipossomas PE-PEG (fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol) são sistemas constituídos por um tipo de fosfolipídios e PEG, que promovem um aumento do tempo de circulação destes sistemas na corrente sanguínea. Enquanto que o ácido fosfatídico é um lipídio que demonstrou, em estudos já realizados, ter elevada afinidade para os agregados de proteína β -amilóide e ser capaz de proteger as células da toxicidade desses agregados *in vitro*. Como possível promotor de passagem na BHE, foi

adicionado um anticorpo monoclonal Ri7217 contra os recetores de transferrina presentes no endotélio da BHE, tornando estes anticorpos ótimos candidatos para auxiliar os lipossomas a alcançar o cérebro.

Com esta formulação imunolipossômica, realizou-se um estudo em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas imortalizadas (Hcmec/D3) que expressavam os recetores de transferrina à superfície. O objetivo deste estudo foi avaliar o *uptake* celular dos imunolipossomas e também a sua permeabilidade através de um modelo de BHE *in vitro* feito com as mesmas células (SALVATI et al., 2013).

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

Ao equacionar um futuro estudo *in vivo*, várias questões devem tentar ser esclarecidas, nomeadamente se a ligação destes imunolipossomas aos peptídeos β -amilóides será eficiente e específica; se esta formulação de lipossomas conjugados com ácido fosfatídico e anticorpos monoclonais Ri7217 será estável no cérebro onde existem concentrações elevadas de β -amilóide; e se a ligação destes imunolipossomas poderá facilitar a eliminação das placas β -amilóides e promover a sua degradação nas células (SALVATI et al., 2013).

Glioblastoma

Os gliomas são tumores cerebrais primários originados em células da glia, podendo ser astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas ou ependimomas. O Glioblastoma multiforme (GBM) é um astrocitoma de grau IV, sendo responsável por 70% de todos os gliomas malignos (CHUNG et al., 2014). As características fisiológicas de um tumor sólido, como o glioblastoma, podem ser usadas em benefício da terapêutica utilizando nanopartículas: o fato de haver coágulos e depósitos de fibrina dentro e à volta do tumor, bem como a formação de neovasos que apresentem fenestrações de

tamanho entre 100-780 nm, permitindo às nanopartículas entrarem nesses neovasos do tumor pelo chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (OLIVEIRA et al., 2012).

l) Micelas DSPE - PEG (2000) conjugadas com o pentapeptídeo CREKA e o fluoróforo Cy7 (CHUNG et al., 2014). As micelas DSPE-PEG (2000) [(diesteril-fosfatidiletanolamina)-polietilenoglicol (2000)] são constituídas por um tipo de fosfolipídios e PEG, que promovem um aumento do tempo de circulação destes nanosistemas na corrente sanguínea, enquanto que o Cy7 é um fluoróforo utilizado para visualizar as micelas *in vivo*. O pentapeptídeo CREKA (cisteína-arginina-ácido glutâmico-lisina-alanina) é um peptídeo que apresenta bastante afinidade para os coágulos de fibrina, segundo estudos previamente realizados noutros tipos de tumores. Assim, este pentapeptídeo é usado nesta formulação para testar a sua capacidade de localizar e de se ligar à fibrina do glioblastoma.

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

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

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram ser bastante promissores numa futura terapêutica para o glioblastoma, podendo tornar a quimioterapia altamente eficiente no tratamento de tumores cerebrais (CHUNG et al., 2014).

Paralisia Cerebral

A paralisia cerebral refere-se a um grupo de distúrbios no desenvolvimento do controle motor e da postura, como resultado de uma lesão não progressiva no desenvolvimento do sistema nervoso central. Portanto, trata-se de uma doença que afeta majoritariamente os bebês, podendo surgir no período pré ou pós natal (BALAKRISHNAN et al., 2013).

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

Os dendrímeros de PAMAM são talvez o tipo de dendrímeros mais estudados nas patologias cerebrais, uma vez que apresentam uma capacidade fantástica de se difundirem através do tecido do SNC *in vivo* e de penetrarem nos neurônios vivos (MASSERINI, 2013). A N-acetilcisteína (NAC) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo um ligante estratégico na medida em que favorece uma libertação neuronal intracelular, pois entra nas células pelo mesmo mecanismo que a glutatona, que é um importante antioxidante que confere neuroproteção às células cerebrais.

Num estudo realizado, procedeu-se da seguinte forma: administraram-se endotoxinas, por via intra-uterina, a coelhas em período de gestação, por forma a induzir uma paralisia cerebral nos coelhos filhos. Desta forma, os filhos nasceram com a doença e neles foi administrado, por via intravenosa, dendrímeros PAMAM-G4-OH com NAC à superfície. Verificou-se que estes sistemas conseguiram ultrapassar a BHE e localizaram-se seletivamente em células associadas à neuroinflamação, como a microglia e os astrócitos, através da difusão pelo parênquima cerebral e endocitose nessas células. Além disto, a localização dos dendrímeros em células saudáveis e o seu *uptake* por parte do cérebro foram mínimos.

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

Os resultados deste estudo comprovaram que é possível obter uma estratégia de tratamento para atenuar lesões cerebrais ocorridas no período pré-natal. Devido à capacidade que os dendrímeros PAMAM-G4OH (4ª geração) apresentaram de alcançar os neurônios e células ativadas da glia de coelhos, fez-se crescer a

hipótese de existir um potencial terapêutico nestes nanovetores, oferecendo a oportunidade para a transposição clínica no tratamento de doenças inflamatórias neurológicas em seres humanos (BALAKRISHNAN et al., 2013).

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

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

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

Apesar destes nanosistemas apresentarem estabilidade na corrente sanguínea, de protegerem o fármaco da degradação enzimática e de promoverem uma libertação prolongada, que são todos pré-requisitos fundamentais na nanomedicina, estes já não são considerados requisitos suficientes para o desenvolvimento de novas terapêuticas eficazes. Assim, atribuir especificidade aos nanovetores e direcioná-los para determinadas células patológicas constitui o mais atual desafio, face às dificuldades na compreensão de alguns mecanismos da nanoquímica e acima de tudo dificuldades na caracterização dos nanosistemas do ponto de vista tecnológico e fisiológico.

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

transportadores de fármacos e de outras moléculas para o cérebro (TOSI, RUOZI & BELLETTI, 2012).

Já existem igualmente nanosistemas patenteados como DDS para o cérebro. Estes dados são indicadores positivos que revelam a progressão dos estudos nas áreas da neurociência e da nanotecnologia, e demonstram que existem boas perspectivas num futuro próximo relativamente ao diagnóstico e à terapêutica nas doenças neurológicas. Todavia, torna-se necessário a realização de mais estudos nesta área, uma vez que os mecanismos moleculares e celulares envolvidos quer na passagem dos nanosistemas através da BHE, quer na sua interação com os tecidos neurológicos alvo não estão totalmente conhecidos e compreendidos. Por outro lado, o delineamento de estudos pré-clínicos bem controlados torna-se um desafio, podendo contribuir com grande impacto para a evolução da nanotecnologia na neurociência clínica.

REFERÊNCIAS

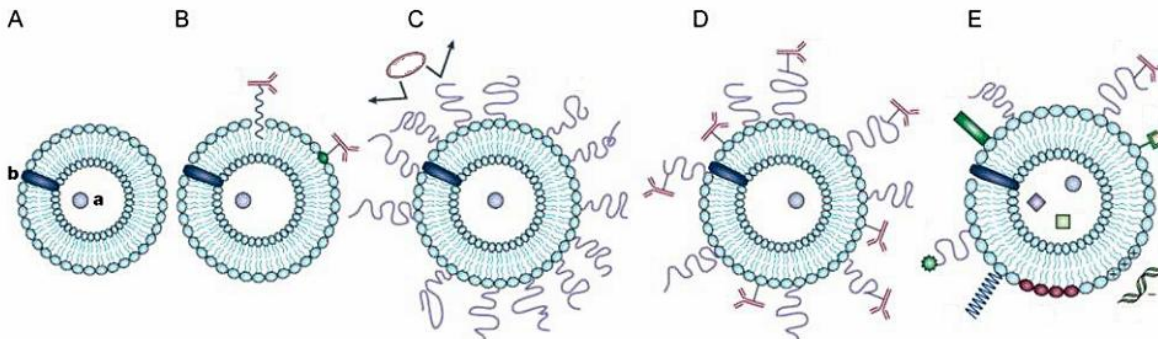
- AKULA, K. K. Revisiting Neuroscience with Nanomedicine, a Renaissance in Remedy. **Innovations in Pharmaceutical and Pharmacotherapy**, 1, 1-60, 2013;
- ALYAUTDIN, R.; KHALIN, I.; NAFEEZA, M. I.; HARON, M. H.; KUZNETSOV, D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, 9, 795-811, 2014;
- ANDRADE, F.; GOYCOOLEA, F.; CHIAPPETTA, D. A.; NEVES, J.; SOSNIK, A.; SARMENTO, B. Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, 2011, 1-14, 2011;
- BALAKRISHNAN, B.; NANCE, E.; JOHNSTON, M.V.; KANNAN, R.; KANNAN, S. Nanomedicine in cerebral palsy. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 4183-4195, 2013;
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 43, 167-179, 2007;
- BEGLEY, D. J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. **Pharmacology and Therapeutics**, 104, 29-45, 2004;
- BEI, D.; MENG, J.; YOUAN, B. B. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. **Nanomedicine**, 5, 1385-1399, 2010;
- BLOUZA, L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone - loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, 325, 124-131, 2006;
- BOAS, U.; CHRISTERSEN, J.B.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools. **Dendrimers: design, synthesis, and chemical properties**, 2006;
- CHAPMAN, M.; PASCU, S.I. - Nanomedicines Design: Approaches towards the Imaging and Therapy of Brain Tumours. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, S4, 2012;
- CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, 14, 1310-1316, 2008;
- CHUNG, E. J.; CHENG, Y.; MORSHED, R.; NORD, K.; HAN, Y.; WEGSCHEID, M. L.; AUFFINGER, B.; WAINWRIGHT, D. A.; LESNIAK M. S.; TIRRELL, M. V. Fibrin-binding, peptide amphiphile micelles for targeting glioblastoma. **Biomaterials**, 35, 1249-1256, 2014;
- CRAMPTON, H.; SIMANEK, E. E. Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. **Polymer International**, 56, 489-496, 2007;
- D'EMANUELE, A. D.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, 2147-2162, 2005;
- DIKPATI, A.; MADGULKAR, A. R.; KSHIRSAGAR, S. J.; BHALEKAR, M. R.; CHAHAL, A. S. Targeted Drug Delivery to CNS using Nanoparticles. **Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences**, 2, 179-191, 2012;
- ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical application. **Drug Discovery Today**, 6, 427-436, 2001;

- FRANCIS, M.F.; CRISTEA, M.; WINNIK, F.M. - Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. **Pure and Applied Chemistry**, 76, 1321-1335, 2004;
- GINGRAS, M.; RAIMUNDO, J.M.; CHABRE, Y.M. - Cleavable Dendrimers. **Angewandte Chemie International Edition**, 46, 1010-1017, 2007;
- HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, 1137-1152, 2008;
- KREUTER, J. Nanoparticles: a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. 331, 1-10, 2007;
- LANGEREIS, S.; DIRKSEN, A.; HACKENG, T. M.; GENDEREN, M. H. P.; MEIJER, E. W. Dendrimers and magnetic resonance imaging. **New Journal of Chemistry**, 31, 1152-1160, 2007;
- LIU, M.; FRÉCHET, J.M. J. Designing dendrimers for drug delivery. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, 2, 393-401, 1999;
- MASSERINI, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. **ISRN Biochemistry**, 2013, 2013;
- MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1184, 154-172, 2010;
- MORSHED, R. A.; CHENG, Y.; AUFFINGER, B.; WEGSCHEID, M.L.; LESNIAK, M. S. The potential of polymeric micelles in the context of glioblastoma therapy. **Frontiers in Pharmacology**, 4, 2013;
- MOURYA, V.K.; INAMDAR, N.; NAWALE, R.B.; KULTHE, S. S. Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 45, 2, 128-138, 2011;
- NAGA ANUSHA, P.; SIDDIQUI, A. Nanomedical Platform for Drug Delivery. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, 2, 2011;
- NATH, D.; BANERJEE, P. Green nanotechnology: A new hope for medical biology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 36, 997-1014, 2013;
- NEHA, B.; GANESH, B.; PREETI, K. Drug Delivery to the Brain using Polymeric Nanoparticles: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, 2, 107-132, 2013;
- NEWKOME, G.R.; KOTTA, K.K.; MOORFIELD, C. N. Design, Synthesis, and Characterization of Conifer-Shaped Dendritic Architectures. **Chemistry - A European Journal**. 12, 3726-3734, 2006;
- OCHEKPE, N.A.; OLORUNFEMI, P.O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 8, 265-274, 2009;
- OLIVEIRA, L. C.; TAVEIRA, E. J. F.; GOMES, L.; MARRETO, R, N.; LIMA, E. M.; TAVEIRA, S. F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 58, 695-701, 2012;
- PROVENZALE, J.M.; SILVA, G. A. Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy. **American Journal of Neuroradiology**, 30, 1293-1301, 2009;
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. - Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, 15, 7, 1056-1062, 1988;
- RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 951-960, 2013;
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 29, 1790-1798, 2006;
- RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.; PRÉAT, V. - Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, 116, 1, 1-27, 2006;

- SALVATI, E.; RE, F.; SESANA, S.; CAMBIANICA, I.; SANCINI, G.; MASSERINI, M.; GREGORI M. Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- β peptide: the chemical design affects the permeability across an in vitro model. **International Journal Nanomedicine**, 8, 1749-58, 2013;
- SARIN, H.; KANEVSKY, A. S.; WU, H.; BRIMACOMBE, K. R.; FUNG, S. H.; SOUSA, A. A.; AUH, S.; WILSON, C. M.; SHARMA, K.; ARONOVA, M. A.; LEAPMAN, R. D.; GRIFFITHS, G. L.; HALL, M. D. Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. **Journal of Translation Medicine**, 18, 6:80, 2008;
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. U.; FREITAS, L. D.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, 26, 5, 2003;
- SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, 154, 123-140, 1997.
- SINGH, A.V.; KHARE, M.; GADE, W. N.; ZAMBONI, P. Theranostic Implications of Nanotechnology in Multiple Sclerosis: A Future Perspective. **Autoimmune Diseases**, 2012;
- SINGH, S.B. - Novel Approaches for Brain Drug Delivery System-Review. **International Journal of Pharma Research and Review**, 2, 36-44, 2013;
- SPUCH, C.; NAVARRO, C. - Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). **Journal of Drug Delivery**, 1-12, 2012;
- STEICHEN, S.D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N.A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Science**, 48, 3, 416-427, 2013;
- SUTTON, D.; NASONGKLA, N.; BLANCO, E.; GAO, J. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. **Pharmaceutical Research**, 24, 1029-1046, 2007;
- TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 71, 431-444, 2009;
- TOSI, G.; RUOZI, B.; BELLETTI, D. Nanomedicine: the future for advancing medicine and neuroscience. **Nanomedicine**, 7, 1113-1116, 2007;
- VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, 70,95-111, 1995;
- VERMA, R.K.; GARG, S. - Current Status of Drug Delivery Technologies and Future Directions. **Pharmaceutical Technology On-Line**, 25, 1-14, 2001;
- ZHANG, N.; WARDWELL, P.R.; BADER, R.A. - Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery. **Pharmaceutics**, 5, 329-352, 2013;

MATERIAL SUPLEMENTAR

Evolução dos lipossomas como DDS:



Fonte: TORCHILIN, 2009.

(A) Lipossoma fosfolipídico convencional com fármaco hidrofílico incorporado no seu interior aquoso e fármaco hidrofóbico incorporado na membrana lipossomal;

(B) Immunolipossoma com anticorpo ligado covalentemente aos fosfolipídios da membrana ou ligado hidrofobicamente na membrana lipossomal após modificações com um grupo hidrofóbico;

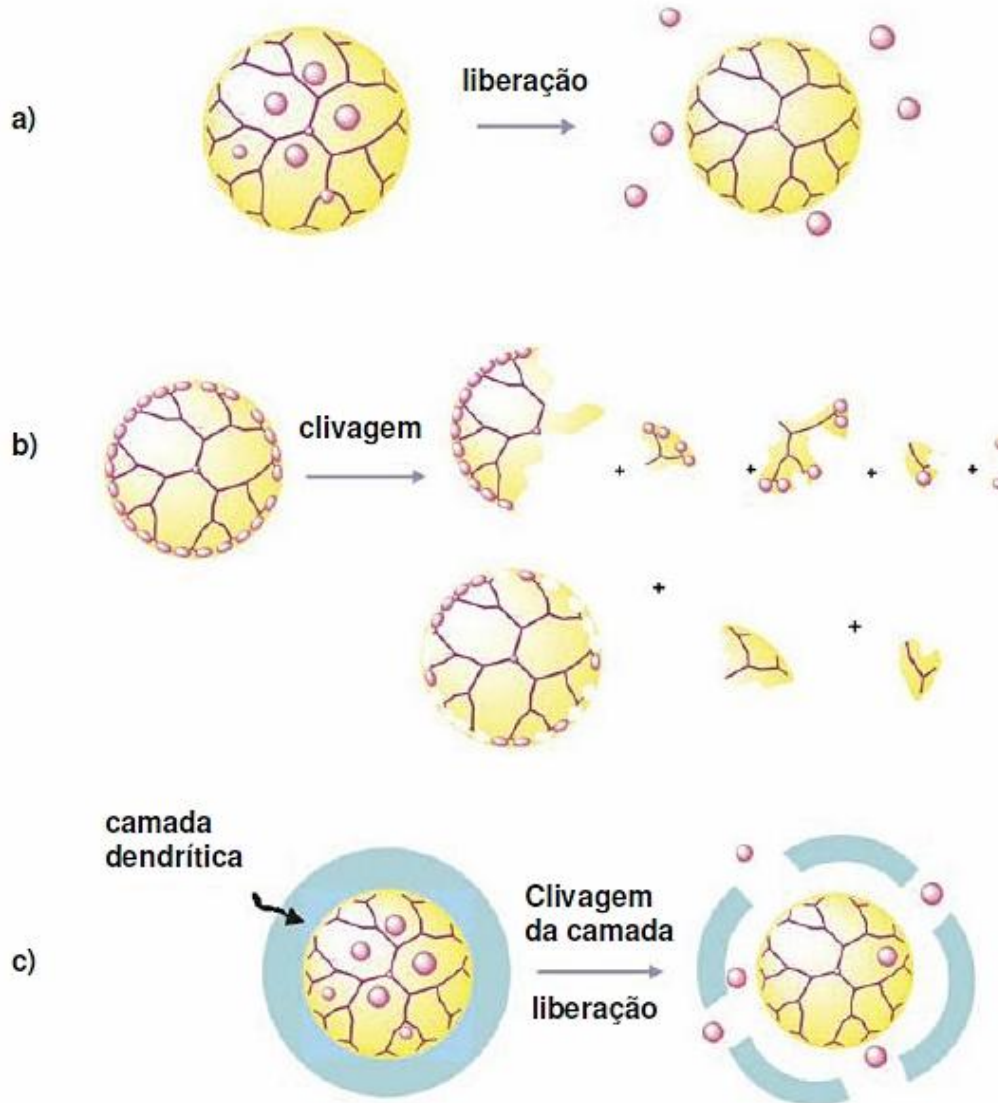
(C) Lipossoma com um polímero protetor, como PEG, que promove um aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea e protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas opsonizantes;

(D) Immunolipossoma de longa circulação, simultaneamente, com polímero protetor e anticorpo, em que este último pode ser ligado à superfície do lipossoma ou, de preferência, à extremidade distal da cadeia polimérica inserida.

(E) Nova geração de lipossomas, em que a superfície pode ser modificada (separadamente ou simultaneamente) de diferentes formas: adição de um polímero protetor (PEG) ou adição de um polímero protetor juntamente com um ligando específico para determinado alvo; incorporação de um marcador de diagnóstico; incorporação de lipídios com carga positiva que permitem a complexação com o DNA, que apresenta carga negativa; incorporação de lipídios sensíveis a estímulos, como temperatura e pH; adição de polímeros que respondem a estímulos; adição de peptídeos que favorecem a penetração nas células; incorporação de componentes virais (TORCHILIN, 2009).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Esquematização dos principais modos de desintegração dos dendrímeros:



- (A) Clivagem supramolecular;
 (B) Clivagem covalente;
 (C) Combinação da clivagem covalente e da clivagem supramolecular (GINGRAS, RAIMUNDO & CHABRE, 2007).