

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA QUETIAPINA NANOENCAPSULADA:
MODELO PARA ESTUDO DE DELIVERY CEREBRAL ATRAVÉS DE UM
NANOCARREADOR POLIMÉRICO**

FERNANDO OLINTO CARREÑO

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA QUETIAPINA NANOENCAPSULADA:
MODELO PARA ESTUDO DE DELIVERY CEREBRAL ATRAVÉS DE UM
NANOCARREADOR POLIMÉRICO**

Dissertação apresentada por
Fernando Olinto Carreño para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa
Co-orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisquaski Guterres

PORTO ALEGRE, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2015 pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Vianna Lopes
Universidade de São Paulo

Profa Dra Stela Maris Kuze Rates
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Carreño, Fernando
Avaliação Farmacocinética da Quetiapina
Nanoencapsulada: Modelo para Estudo de Delivery
Cerebral Através de um Nanocarreador Polimérico /
Fernando Carreño. -- 2015.
217 f.

Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.
Coorientadora: Sílvia Stanisquaski Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nanocápsulas poliméricas . 2. Farmacocinética.
3. Microdiálise . 4. Penetração Cerebral. I. Dalla
Costa, Teresa Cristina Tavares, orient. II.
Guterres, Sílvia Stanisquaski, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento CNPq e CAPES. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

“Felicidade se acha é só em horinhas de descuido...”

(João Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

É extremamente gratificante poder tecer nessas linhas meus sinceros agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram e me inspiraram para que chegasse até aqui.

Aos meus pais Felipe e Maura Carreño, pelo apoio incondicional e por muitas vezes colocarem a minha vida antes de suas próprias. Obrigado por todo amor que me transmitem diariamente, e por terem me ensinado que não existem distâncias físicas na busca dos nossos sonhos e que sempre a família estará ao nosso lado, não importa onde estivermos.

À minha irmã Flávia Carreño, grande responsável pela minha paixão pelas ciências, agradeço pelo amor, carinho e amizade. Pelos momentos divertidos e também por aqueles em que falamos sério. É muito bom saber que posso contar sempre com você.

À minha namorada Caroline Francisco, pelo amor, carinho e respeito compartilhado diariamente. Obrigado por colorir os meus dias e me fazer um homem melhor e mais feliz. É muito bom saber que você está aqui em mais essa conquista. Que venham as próximas e que sejam ao seu lado: Te Amo!

Ao “*Garden All*”: Camila Scarel, Bôris (Carol Donini), Marina Aleixo, Mário Tassinari, Caio Pelosi e Taka (Talita Takamune). Vocês são o melhor “jardim” do mundo e o maior exemplo de que verdadeiras amizades resistem a distância e ao tempo. Obrigado por apoiarem as minhas decisões e me estimularem a buscar meus sonhos, estejam eles onde estiverem.

À família Grigio Francisco, que me acolheu de braços abertos, sempre se interessaram pelo meu trabalho e vibram sempre comigo em cada momento de conquista na minha vida profissional e pessoal.

Aos queridos amigos farmacocinéticos (Pks): Izabel Alves, Jaqueline Fabrício, Andressa Braga, Bruna Torres, Maiara Pigatto, Priscila Bernardi, Arielle Turcatel, Camila Néris, Victória Helfer, Julia Rist, Graziela Lock, Daiane Lima, João Victor Laureano, Estevan Zimmerman, Fernanda Galves, Eduardo Palma e Ana Lúcia Xavier. Muito obrigado por terem acolhido “o paulista” de braços abertos, obrigado por dividirem comigo as experiências diárias de trabalho, as discussões científicas, o estresse e a felicidade da pós graduação, cafés, almoços e também pelas aulas de língua e cultura gaúcha. Vocês todos são a minha família em Porto Alegre.

À Dra. Carolina Miranda Silva, pelo exemplo profissional e amizade construída durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por todas as explicações e treinamentos, pelas discussões científicas, por sempre me ajudar a solucionar os mais diversos problemas “casuísticos e determinísticos” e pelo auxílio e comprometimento com o projeto no trabalho de bancada.

À Dra. Karina Paese que foi peça chave durante o desenvolvimento das nanocápsulas. Fico muito agradecido pelo seu comprometimento com o projeto, por estar sempre disponível, pelo seu bom humor irradiante, pela forma didática com que me apresentou o “nanomundo”. Obrigado por me motivar sempre que os resultados não pareciam promissores e pela vibração sincera e entusiástica com cada um dos resultados positivos.

Ao Prof. Daniel Kawano, agradeço toda dedicação nas etapas iniciais do desenvolvimento desse trabalho e pela amizade construída. Agradeço também aos queridos professores da Universidade Estadual de Maringá, Profa Dra. Márcia Brito e Prof. Dr. Nilton Brito, por terem me recebido com tanta empolgação em seu laboratório e pelo carinho e entusiasmo com que me ensinaram as técnicas cirúrgicas que foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Às meninas do laboratório de Neuropsicofarmacologia Experimental, em especial a Camila Boque que foi com quem aprendi a cirurgia de MD cerebral. Agradeço também, aos colegas do laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e aos demais colegas que fiz em outros laboratórios da Faculdade de Farmácia que me acompanharam durante esses dois anos de trabalho.

À querida Profa Dra. Andréa Diniz. As escolhas feitas na nossa vida são, de certa forma, influenciadas pelas pessoas que cruzam nosso caminho. Muito obrigado por ter me apresentado o “mundo mágico” da farmacocinética.

À minha querida amiga e primeira orientadora Profa. Dra. Jorgete Constantin. Muito obrigado por todo treinamento e oportunidades que me foram oferecidas durante os anos de LMH. Muito da minha personalidade profissional hoje é um reflexo do que pude aprender e me inspirar olhando sua maneira de trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Sílvia Guterres, exemplo de profissional de sucesso e peça fundamental para que o trabalho com as nanopartículas seguisse adiante.

E por fim, meu agradecimento especial à minha orientadora Profa Teresa Dalla Costa. Agradeço de coração por ter confiado em meu trabalho e ter me recebido tão bem em seu laboratório. Obrigado por estar sempre disponível, pela orientação, discussões científicas e oportunidades proporcionadas. Você é um exemplo de assertividade, foco e sucesso profissional.

RESUMO

Introdução: A barreira hematoencefálica limita a penetração de compostos farmacologicamente ativos para o cérebro devido à presença de zônulas de oclusão no endotélio cerebral e a expressão de transportadores de influxo e efluxo que modulam o acesso de fármacos para o parênquima cerebral. Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) tem sido estudadas como carreadores de fármacos para o tecido cerebral devido à capacidade de modulação da farmacocinética desses compostos. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre os processos envolvidos nas alterações farmacocinéticas e na distribuição tecidual promovidas por esses transportadores. **Objetivo:** Pretendeu-se investigar as alterações na farmacocinética plasmática e penetração cerebral da quetiapina (QTP) nanoencapsulada em ratos Wistar. **Materiais e Métodos:** QLNC (1mg/mL) foram obtidas através da metodologia de nanoprecipitação e apresentaram reduzido tamanho de partícula (143 ± 6 nm), baixo índice de polidispersão ($PI < 0.1$), alta eficiência de encapsulação (96%), potencial zeta negativo (-7.65 ± 0.815 mV) e pH ácido. QLNC quando visualizadas por MET apresentaram tamanho esférico, homogêneo com ausência de agregados. Os estudos *in vivo* desse trabalho foram aprovados pelo CEUA/UFRGS. Análise do plasma total e a utilização da microdiálise para determinação das concentrações plasmáticas e cerebrais livres foram realizadas após administração intravenosa da formulação de nanocápsulas de QTP (5 mg /kg) (QLCN) ou do fármaco em solução (FQ) (5 mg /kg e 10 mg /kg) na presença e na ausência de 30 mg /kg de probenecida (PB), um inibidor de transportadores de membrana. Métodos validados foram utilizados para a quantificação do fármaco em diferentes matrizes. As concentrações cerebral e hepática totais foram investigadas através da técnica de homogeneizado de tecido. Além disso, a fração livre no plasma (f_u) e a penetração nos eritrócitos também foi realizada. **Resultados:** QTP apresentou farmacocinética linear na faixa de doses investigadas, é um substrato para transportadores de efluxo na BHE. Diferenças foram observadas na f_u da QTP até 2 h após administração de QLNC indicando que LNC do tipo III promove uma liberação sustentada do fármaco do carreador. QLNC não foi capaz de alterar o coeficiente de partição nos eritrócitos determinado *in vitro*. As concentrações cerebrais e hepáticas totais foram aumentadas após administração da formulação de nanocápsulas, porém, as concentrações cerebrais livres não foram alteradas em comparação com o QTP em solução. Após administração de PB o fator de penetração da QTP livre no cérebro foi reduzido de $1,55 \pm 0.17$ para $0,94 \pm 0,15$. Porém, essa inibição pela probenecida não teve efeito na penetração cerebral de QLNC ($0,88 \pm 0,21 - 0,92 \pm 0.13$) provavelmente devido ao fato da QTP ser carreada pela LNC e não estar disponível para interagir com transportadores. **Conclusão:** Considerando todos os resultados sugere-se que as LNC do tipo III carregam a QTP através da circulação sistêmica até o parênquima cerebral.

Palavras-chave: Nanocápsulas poliméricas, penetração cerebral, microdiálise, quetiapina

ABSTRACT

PHARMACOKINETIC INVESTIGATION OF NANOCAPSULATED QUETIAPINE: A MODEL TO STUDY DRUG DELIVERY TO THE BRAIN BY POLYMERIC NANOCARRIERS

Introduction: Blood-brain barrier (BBB) hinders the delivery of therapeutics to central nervous system due to the endothelial cells tight junctions, which restrict paracellular transport of substances, and the expression of influx and efflux transporters, which modulate drugs access to the brain. Lipid-core nanocapsules (LNC) have been proposed as drug carriers to improve brain delivery by modulating drug pharmacokinetics (PK). However, little is known about this modulation process and it is not clear whether the LNC carry the drug through the BBB or increase free drug penetration due to changes in the barrier permeability. **Objective:** The work aimed to investigate the alterations in the model drug quetiapine (QTP) plasma PK and brain penetration following nanoencapsulation into LNC (QLNC) using microdialysis. **Methods:** QLNC ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were obtained by nanoprecipitation and presented small particle size ($143 \pm 6 \text{ nm}$), low polydispersity index ($\text{PI} < 0.1$), high incorporation efficiency (96%), negative zeta potential ($-7.65 \pm 0.815 \text{ mV}$) and acidic pH. TEM photomicrography showed spherically shaped particles and absence of aggregation. Animal studies approved by CEUA/UFRGS. Total plasma and free plasma and brain concentrations, last two determined by microdialysis, were analyzed after QLNC (5 mg/kg) and free drug (FQ – 5 and 10 mg/kg) i.v. dosing to Wistar rats alone or following probenecid (PB), an influx transporter inhibitor, i.v. administration (30 mg/kg). Drug was quantified in all matrices by validated LC/UV methods. Total brain and liver concentration after FQ and QLNC dosing were investigated in tissues homogenate. Furthermore, QTP free fraction (f_u) in plasma and erythrocyte penetration were determined. **Results:** QTP presented linear PK in the dose range investigated and is substrate to influx transporters at the BBB. Differences observed on QTP f_u up to 2 h after QLNC dosing indicate a drug slow release in the blood stream loaded into the LNC type III nanocarrier for this period of time. The LNC did not alter QTP erythrocytes partition coefficient. Total brain and liver concentrations were increased after QLNC dosing but free brain concentrations were not altered in comparison with FQ dosing. After PB dosing, QTP brain penetration was reduced from 1.55 ± 0.17 to 0.94 ± 0.15 when FQ was administered but the inhibition of influx transporters had no effect on QLNC brain penetration (0.88 ± 0.21 to 0.92 ± 0.13) probably because QTP is loaded into the LNC and not available to interact with transporters. **Conclusions:** Taking together these results suggested that LNC type III carries QTP in the blood stream and delivers the drug to the brain.

Key-words: Lipid-core nanocapsules, brain penetration, microdialysis, quetiapine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. BARREIRAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	21
3.1.1. Aspectos Anatômicos e Fisiológicos da BHE	22
3.1.2. Componentes e Características Moleculares da Barreira Hematoencefálica	24
3.1.2.1. Zônulas de oclusão e adesão.....	24
3.1.2.2. Matriz extracelular	26
3.1.2.3. Astrócitos.....	26
3.1.2.3. Pericitos.....	27
3.1.3 – Barreira Hemato-Liquórica.....	27
3.2. MECANISMOS DE TRANSPORTE ATRAVÉS DA BHE	28
3.2.1. Difusão Passiva	30
3.2.2. Mecanismos de Difusão Facilitada	31
3.2.3. Endocitose	32
3.2.4. Transporte Ativo.....	33
3.3. EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE INFLUXO E EFLUXO NAS BARREIRAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	33
3.3.1. Principais transportadores de efluxo expressos na BHE	35
3.3.1.1. Glicoproteína- P (P-gp).....	35
3.3.1.2. Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) e proteína associada à multirresistência aos fármacos (MRPs)	37
3.3.2. Principais Transportadores de Influxo Expressos na BHE.....	39
3.3.2.1. Superfamília dos carreadores de solutos orgânicos (SLC).....	39
3.3.2.2. Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs/Oatps)	41
3.3.2.2. Transportadores de ânions orgânicos (OATs/Oats)	43
3.3.2.3. Transportadores de cátions orgânicos (OCTs/Octs)	43

3.4. <i>DELIVERY</i> DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS PARA O SNC	45
3.5. CARREADORES COLOIDAIS DE FÁRMACOS PARA <i>DELIVERY</i> CEREBRAL.....	48
3.5.1 <i>Nanopartículas Poliméricas e Sua Potencial Aplicação no Delivery Cerebral de Fármacos</i>	51
3.6. MICRODIÁLISE COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DO <i>DELIVERY</i> CEREBRAL E SISTEMAS COLOIDAIS	54
3.7. QUETIAPINA	55
CAPÍTULO 1	58
CAPÍTULO 2	83
CAPÍTULO 3	120
CAPÍTULO 4	147
4. DISCUSSÃO GERAL	183
5. CONCLUSÕES	193
6. REFERÊNCIAS	197
7. ANEXOS	214

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais e neurológicos são altamente prevalentes na população mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 12% das mortes no mundo estejam relacionadas com algum tipo de doença do Sistema Nervoso Central (SNC) entre elas as doenças neurodegenerativas (Mal de Parkinson, Alzheimer), os transtornos psíquicos (depressão, esquizofrenia), a epilepsia, as doenças cerebrovasculares (acidente vascular cerebral, isquemia) e os tumores cerebrais (WHO, 2009)

Atualmente, as limitações físicas, os problemas cognitivos e psicossociais e os estigmas decorrentes das doenças neurológicas são em grande parte responsáveis pelo aumento no tempo de hospitalização dos pacientes, afetando diretamente a produtividade e o orçamento dos sistemas de saúde. Dessa forma, as doenças neurológicas tornam-se um grave problema de saúde pública que afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento (LANGE, 2013). Além disso, o envelhecimento e o aumento da expectativa de vida da população mundial contribuem de forma direta para o aumento da prevalência de uma série de distúrbios neuropsicológicos. Estimativas apontam que em 2020 a participação das doenças do SNC no total de mortes no mundo será de aproximadamente 15% (WHO, 2009).

Apesar desse quadro problemático, há um avanço exponencial da neurociência na atualidade, com uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas patologias do SNC, a identificação de novos alvos terapêuticos no cérebro e o desenvolvimento de uma série de novos candidatos a fármacos para o tratamento dessas doenças (HAMMARLUND-UDENAES et al., 2008). Entretanto, a maioria dos compostos sob investigação para o tratamento de doenças que afetam o SNC tem falhado em testes pré-clínicos ou clínicos devido à incapacidade de atingir o sítio de ação ou de manter concentrações efetivas no tecido cerebral (HAMMARLUND-UDENAES et al., 2008; LANGE, 2013; LINDQVIST et al., 2013). Os principais obstáculos fisiológicos descritos atualmente para a disposição dos compostos farmacologicamente ativos no cérebro são: a barreira hematoencefálica (BHE), a barreira do líquido

cefalorraquidiano e os mecanismos cerebrais de efluxo (LEMAIRE; DESRAYAUD, 2005; WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

A BHE foi descrita pela primeira vez pelo cientista alemão Paul Erlich em 1985 e está presente em todos os animais vertebrados. É formada por células endoteliais dos capilares cerebrais que se unem por estreitas junções devido à expressão de proteínas juncionais bloqueadoras (claudinas e ocludinas) nesses capilares (CORNFORD, 1999). A BHE é altamente seletiva e possui duas funções principais: manter a homeostase cerebral regulando a entrada de nutrientes endógenos e a saída de produtos do metabolismo cerebral e proteger o órgão de xenobióticos. A alta seletividade da BHE frequentemente limita a penetração ou a obtenção de concentrações efetivas de fármacos com ação central (DEGUCHI; MORIMOTO, 2001). Outros fatores que podem condicionar a passagem de fármacos pela BHE são: a alta resistência elétrica do endotélio cerebral (entre 1500 a 2000 Ωcm^2), a presença de pericitos e astrócitos que atuam como mecanismos de defesa e a presença de transportadores de efluxo como, por exemplo, a glicoproteína-P (Pgp) (FRICKER; MILLER, 2004).

Com o objetivo de desenvolver novos fármacos que tenham uma boa penetração cerebral e que alcancem concentrações terapêuticas no sistema nervoso central é fundamental o entendimento dos mecanismos que envolvem o influxo e o efluxo através da barreira hematoencefálica (PRAJAPATI, 2012) permitindo assim a proposição de estratégias para driblar as barreiras existentes.

A utilização de sistemas nanoparticulados (nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outros) tem demonstrado ser uma estratégia promissora para melhorar a entrega e a disposição de fármacos no SNC em diferentes patologias.

Estudos relatados na literatura evidenciam a eficiência da utilização de nanopartículas para aumentar a penetração cerebral de fármacos. Gao e Jiang (2006) demonstraram um aumento nos níveis cerebrais de metotrexato nanoencapsulado em uma matriz polimérica constituída de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) em modelo animal. Garcion e colaboradores (2006), utilizando nanocápsulas de ácido cáprico e caprílico, obtiveram um aumento da meia-vida

cerebral do paclitaxel de 21 min para mais de 5 horas, além da diminuição da progressão do tumor cerebral em ratos. Priano e colaboradores (2011) demonstraram que a nanoencapsulação de baclofeno em sistema nanoparticulado de ácido esteárico sólido manteve por mais tempo a concentração plasmática e o efeito sedativo em ratos quando comparado com o fármaco na forma livre.

Apesar de parecerem promissores, os mecanismos envolvidos na interação de sistemas nanoparticulados com as barreiras anatômicas e bioquímicas do SNC ainda são pouco conhecidos (WONG; WU; BENDAYAN, 2012). Questões como - “Qual o mecanismo envolvido na entrega de fármaco por esses sistemas?”, “A nanopartícula efetivamente permeia a BHE?”, “Existe uma interação entre as membranas biológicas e os sistemas nanoparticulados?”, “Qual a relação desses sistemas com os transportadores presentes na barreira hematoencefálica?” - permanecem, ainda, sem resposta.

Uma técnica efetiva para o estudo da disposição cerebral de fármacos é a microdiálise (HAMMARLUND-UDENAES, 2000; ZHANG et al., 2012), que atualmente é uma das formas mais promissoras e importantes para a determinação da distribuição tecidual da fração livre e da farmacocinética de moléculas de interesse farmacêutico, sendo amplamente utilizada em testes pré-clínicos com animais. Essa técnica permite a avaliação da concentração tecidual de fármacos em diversas regiões do cérebro e pode ser uma ferramenta importante para comparar as diferenças na permeação tecidual tanto de moléculas livres quanto nanoencapsuladas (RE; GREGORI; MASSERINI, 2012).

Nesse contexto, esse trabalho pretende ampliar o entendimento do mecanismo de disposição de fármacos no tecido cerebral quando incorporados em nanopartículas utilizando a microdiálise cerebral, microdiálise plasmática e a quetiapina como fármaco modelo.

A escolha da quetiapina como fármaco modelo para esse estudo está relacionada às suas características físicas tais como $\log D_{7,4}$ e $\log P$, que indicam que a molécula é um candidato adequado para formação de uma nanocápsulas polimérica tipo III, de acordo com classificação proposta por (2012), ou seja, a maior parte do fármaco encontra-se no núcleo da nanocápsula. Ainda, a

quetiapina exerce atividade antipsicótica em doses baixas (5 mg/kg em animais), é passível de ser quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na região do ultravioleta (UV), além de evidências da literatura que apontam esse fármaco como substrato da Pgp (BOULTON et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar *in vivo*, através da técnica de microdialise cerebral e plasmática, a capacidade de penetração cerebral de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico utilizando a quetiapina como fármaco modelo para o estudo.

Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar sistemas nanoparticulados poliméricos contendo quetiapina;
- Desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação da quetiapina em amostras de plasma, microdialisado cerebral e plasmático e para quantificação do fármaco associado às nanopartículas;
- Avaliar e comparar a farmacocinética plasmática, a fração livre no plasma e a penetração cerebral da quetiapina em roedores após a administração intravenosa do fármaco nanoencapsulado e livre, na presença e na ausência da probenecida (inibidor de transportadores de membrana).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Barreiras do Sistema Nervoso Central

O SNC é anatomicamente constituído, nos mamíferos, pelo encéfalo e pela medula espinhal (ABBOTT, 2005). O encéfalo é protegido pelo crânio, enquanto que a medula espinhal é protegida pela coluna vertebral. Tanto o encéfalo quanto a medula espinhal são ainda envolvidos por membranas de tecido conjuntivo chamadas meninges. No espaço entre as meninges e o encéfalo encontra-se o líquido cerebrospinal, que tem a função de nutrir o SNC e também amortecer e proteger o mesmo contra movimentos súbitos (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). A unidade funcional do SNC é o neurônio, e são as redes neuronais as principais responsáveis pelo controle dos organismos vivos através da regulação da maioria das atividades corporais, como por exemplo, a respiração.

Devido ao seu elevado grau de complexidade o SNC é extramente vulnerável à ação de xenobióticos e patógenos (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). Dessa maneira, o SNC possui um ambiente interno exclusivo e de composição precisamente controlada, sendo a passagem de substâncias endógenas ou exógenas estritamente dependente da permeabilidade altamente seletiva das barreiras encefálicas: a BHE e a barreira hemato-liquórica (BHL).

A principal função dessas barreiras é a de impedir a troca irrestrita de moléculas entre o líquido extracelular das células neuronais e o sangue presente na circulação periférica sistêmica, mantendo assim, a homeostase do SNC através do influxo de compostos essenciais como glicose, eletrólitos e aminoácidos e do efluxo e proteção das células de substâncias potencialmente neurotóxicas e patógenos que podem estar presentes no sangue circulante (MULDOON et al., 2013).

Apesar de fundamentais para a homeostase do SNC, a presença dessas barreiras, especialmente a BHE, têm sido um dos fatores limitantes para o surgimento de farmacoterapias efetivas para o tratamento de doenças como o Parkinson, Alzheimer, tumores cerebrais, esquizofrenia entre outras (RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013). Isso se deve ao fato de, por muito tempo, o processo de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos de ação central ter focado

principalmente na seleção de compostos que apresentassem atividade *in vitro* em sítios de ação específicos do cérebro, sem, entretanto, se preocupar com o *delivery in vivo* da molécula no sítio alvo. Dessa maneira, muitas moléculas falharam e foram descartadas, muitas vezes ainda durante a fase pré-clínica, devido a inabilidade de permear a BHE e manter concentrações efetivas no local de ação no SNC.

Nesse contexto, o desenvolvimento e a adoção de estratégias, sejam elas substituições na molécula que alterem suas propriedades físico-químicas ou a utilização de nanopartículas, que contribuam para melhoria do *delivery* cerebral de fármacos para o SNC é extremamente necessária na atualidade e o entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de penetração através da BHE são fundamentais para que novos fármacos de ação central cheguem ao mercado.

3.1.1. Aspectos Anatômicos e Fisiológicos da BHE

A BHE é a responsável por separar o compartimento sanguíneo periférico do parênquima cerebral e impedir ou dificultar a passagem de substâncias do sangue para o SNC (KELLER, 2013).

Anatomicamente a BHE é constituída pelo endotélio dos capilares cerebrais (CE), pericitos e a lâmina basal (matriz proteica), a qual fornece suporte mecânico para a adesão celular. Em associação com astrócitos, neurônios e outras células da glia compreendem o que é chamado de unidade neurovascular (UNV) e está representada na Figura 1 (BONKOWSKI et al., 2011).

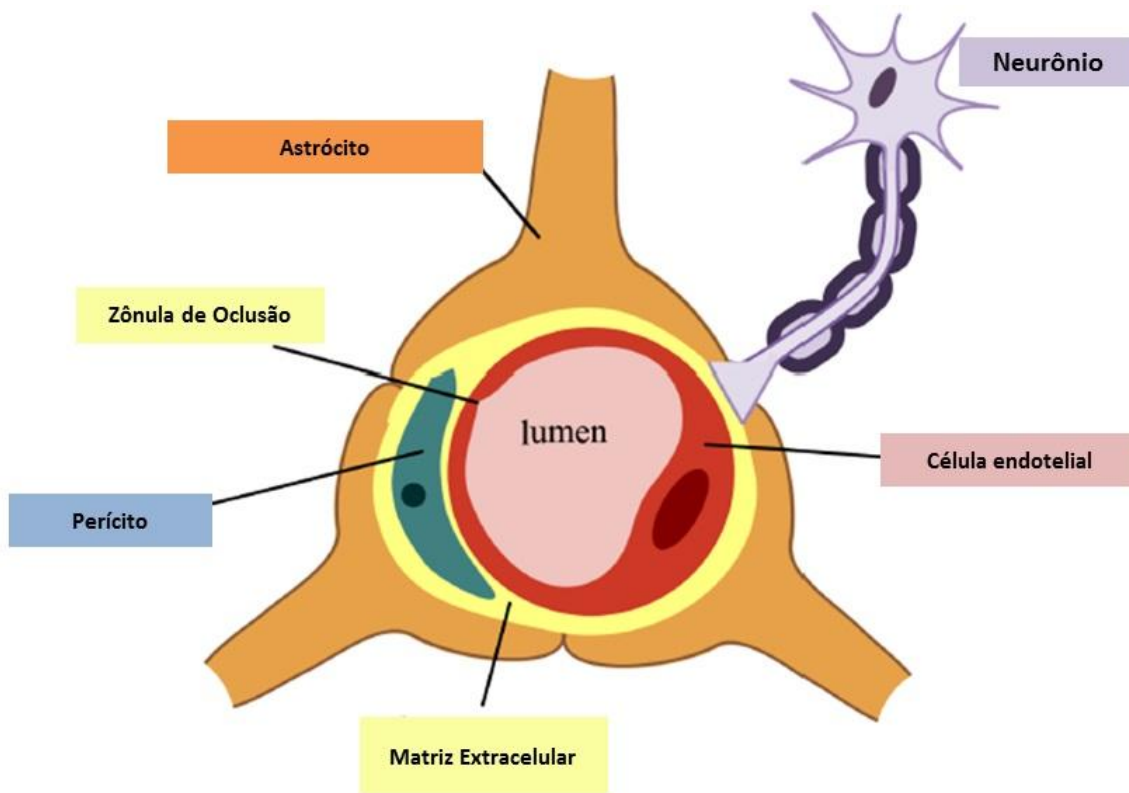


Figura 1. Secção transversal de um capilar cerebral evidenciando os componentes da Unidade neurovascular (UNV). (Adaptado de Sanchez-Covarrubias, 2014).

A UNV representa a interface entre o SNC e o sistema vascular (KELLER, 2013; LINDQVIST et al., 2013; SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). As inter-relações presentes entre as células da UNV são responsáveis por facilitar o transporte de nutrientes, regular o balanço eletrolítico cerebral e impedir a penetração ou o acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas no tecido nervoso (LI et al., 2012). Além disso, a interação entre os astrócitos, as células do endotélio cerebral (CE) e os neurônios localizados próximos às CEs são de extrema importância para a manutenção da morfologia e da funcionalidade da BHE (BONKOWSKI et al., 2011). Perturbações de qualquer um dos componentes da UNV, seja resultante de um estresse farmacológico ou fisiológico, podem causar alterações da integridade da BHE e alterar a permeabilidade da microvasculatura cerebral (MARK; DAVIS, 2002)

Quando comparadas às células dos capilares presentes na circulação sistêmica as células endoteliais na BHE possuem características particulares

como um aumento da quantidade de mitocôndrias, redução no transporte vesicular (pinocitose) e ausência de fenestrações (JEFFREY; SUMMERFIELD, 2010). Um aumento na densidade de mitocôndrias presentes nesse tecido é explicado devido a necessidade de um maior aporte energético das CEs na manutenção dos diversos tipos de mecanismos de transporte de íons, nutrientes e produtos do catabolismo celular para dentro e para fora do parênquima cerebral (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014; VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003).

Uma série desses mecanismos de transporte presentes na BHE têm sido apontados como os principais responsáveis pelo influxo e efluxo de fármacos para o SNC. Dentre os principais transportadores de efluxo expressos na BHE podem ser citados: a glicoproteína-P (P-gp), a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) e proteínas associada a resistência a multidroga (MRP). Por outro lado, os principais transportadores de influxo de fármacos para o SNC incluem: transportadores de ânions orgânicos (OATPs), transportadores de cátions orgânicos (OCTs), transportadores de nucleosídeos (NT), transportadores de monocarboxilatos (MCTs) e sistemas de transporte de peptídeos (MIKKAICHI et al., 2004; RONALDSON et al., 2004; TAMAI; TSUJI, 2000; UCHIDA et al., 2011) (TAMAI, 2000; BENDAYAN, 2009; SUZUKI et al., 2010). Além disso, há expressão de isoformas do citocromo P450 (CYP) em alguns neurônios e células da glia presentes na BHE, permitindo assim a biotransformação de certos fármacos (OHTSUKI; TERASAKI, 2007).

3.1.2 Componentes e Características Moleculares da Barreira Hematoencefálica

3.1.2.1. Zônulas de oclusão e adesão

Dois tipos de junções intercelulares estão presentes na BHE: as zônulas de oclusão (ZO) e as zônulas de adesão (ZA). Através das ZOs as membranas plasmáticas das células adjacentes formam um anel contínuo ao redor das células epiteliais enquanto que as ZAs permitem a adesão intercelular, estando

diretamente envolvida na regulação da permeabilidade da ZA (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003). Essas junções são particularmente relevantes na redução do transporte paracelular de íons e solutos.

Em relação a composição dessas junções a ZO é formada por três classes de proteínas transmembrana: claudinas, ocludinas e as moléculas de adesão junctional (*junction adhesion molecule* – JAM) (Figura 2). As claudinas possuem a capacidade de associarem-se entre si através de dímeros, reduzindo as fenestrações do epitélio vascular cerebral. As ocludinas são altamente expressas no endotélio cerebral e tem função regulatória, podendo alterar a permeabilidade paracelular. Já a JAM, proteína membro de uma super família de globulinas, está associada principalmente com a regulação da migração de monócitos através da BHE, bem como em processos de adesão de células adjacentes (RUNKLE; MU, 2013).

As ZAs são compostas principalmente por caderinas, glicoproteínas expressas em diversos tecidos, e que tem seu mecanismo de adesão dependente de cálcio. As células endoteliais expressam dois tipos principais de caderinas: N-caderinas e VE-caderinas (*vascular endothelial cadherin*)(STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008).

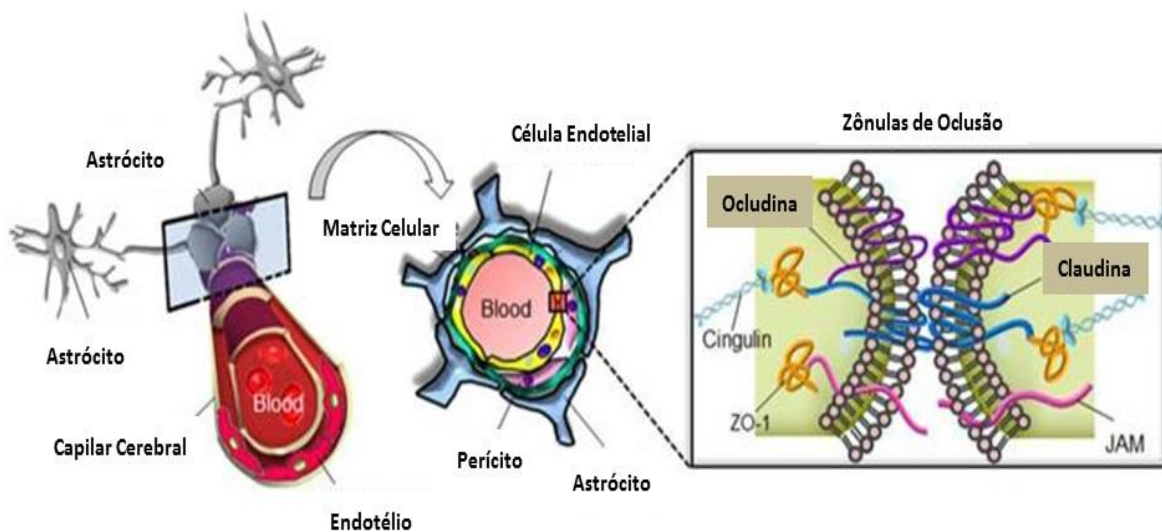


Figure 2. Distribuição das zônulas de oclusão no barreira hematoencefálica (Adaptado de Liu et al. 2014)

O impedimento do transporte paracelular de íons imposto pelas ZOs e ZAs confere um alta resistência elétrica *in vivo* à BHE (entre 1500 a 2000 Ωcm^2), demonstrando, portanto, a eficácia dessas junções em reduzir as fenestrações no endotélio cerebral e limitar a passagens paracelular de íons (STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008). Lohmann e colaboradores (2002) demonstraram que o polietilenoglicol (PEG) possui a capacidade de relaxar de forma temporária as junções das células epiteliais que formam a BHE, diminuindo a resistência elétrica normal que as mantém unidas, atuando como um facilitador para a passagem de substâncias para o tecido cerebral.

3.1.2.2 Matriz extracelular

O espaço extracelular compreende aproximadamente 20% do volume cerebral (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011). Esse espaço está completamente preenchido pela matriz extracelular (MEC) altamente organizada e composta por proteoglicanos, proteínas estruturais tais como colágeno e elastina e proteínas especializadas como a laminina e a fibronectina. Além disso, fazem parte da MEC moléculas de adesão (MAC) e proteínas de sinalização celular.

A MEC tem a função de ancorar o endotélio, principalmente através de integrinas que permitem uma interação célula-matriz e o funcionamento de diversas vias de sinalização intracelular tanto nas células vasculares, quanto em neurônios e células da glia. A MEC participa ainda da manutenção de proteínas da ZO e ZA e dessa maneira, alterações nos componentes dessa matriz podem levar a um aumento da permeabilidade da BHE, por exemplo, durante estados patológicos (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

3.1.2.3 Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no cérebro. Apresentam formato estrelado e sua morfologia é influenciada, principalmente, por sua localização no SNC (RONALDSON; DAVIS, 2012). Os prolongamentos finais

dos astrócitos estão intimamente aderidos à superfície externa do endotélio cerebral permitindo assim uma importante interação dos astrócitos com as células endoteliais, conferindo aos astrócitos, dentre outras, a capacidade de regular e manter as características fisiológicas de tônus e adesão da BHE.

Além disso, os astrócitos expressam uma série de transportadores de efluxo incluindo isoformas de P-gp, BCRPs e MRPs (RONALDSON; DAVIS, 2012). A presença de transportadores de efluxo nesse tipo celular sugere que os astrócitos funcionam como um segundo sistema de barreira, limitando a penetração e distribuição de fármacos para o parênquima cerebral (RONALDSON; DAVIS, 2012).

3.1.2.3. Pericitos

Pericitos são células cerebrais contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar e são capazes de expressar moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e metaloproteinases de matriz (MMPs), que são fundamentais para manutenção da integridade da BHE (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

Associado a essa capacidade vascular, os pericitos contribuem para a manutenção das junções celulares através da secreção de sinalizadores que induzem a proliferação de proteínas (occludinas) nas ZO's da BHE (SÁ-PEREIRA; BRITES; BRITO, 2012). Estudos realizados por Winkler e colaboradores (2012) demonstraram que a redução na quantidade de pericitos no tecido vascular do SNC aumenta a permeabilidade desses tecidos a compostos presentes no sangue periférico.

3.1.3. Barreira Hemato-Liquórica

A BHL localiza-se nos plexos corioides, estruturas enoveladas compostas por dobras da pia-máter e grande número de vasos sanguíneos. Os plexos corioides apresentam epitélio endotelial modificado devido a presença de

zônulas de oclusão que mantêm as células próximas à superfície ventricular, limitam a difusão paracelular e reduzem os processos de pinocitose e exocitose (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009).

Além de servir de barreira para a distribuição de substâncias para o SNC o plexo coriódio presente na BHL é o responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano (LCR) que é secretado no terceiro e quarto ventrículos bem como no ventrículo lateral. Esse líquido é responsável pelo suprimento de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos do SNC (STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2015).

A secreção de LCR é ocorre através de bombas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPases e por anidrases carbônicas e é regulada pela troca iônica através do epitélio dos plexos corioides. O LCR é continuamente secretado e reabsorvido sendo seu volume total substituído cerca de 3 a 4 vezes por dia. Dessa maneira, atinge-se uma condição *sink* que impede que haja uma saturação das concentrações de substâncias que chegam ao LCR e ao parênquima cerebral via BHL (SPEAKE et al., 2001).

As funções de proteção e secreção dos plexos corioides são determinadas através de uma série de transportadores expressos por toda a BHL que permite uma regulação extremamente precisa das concentrações de íons e de nutrientes do LCR, bem como a eliminação de produtos do metabolismo cerebral e a limitação da entrada de substâncias potencialmente neurotóxicas para o parênquima cerebral (DAMKIER; BROWN; PRAETORIUS, 2010; SPEAKE et al., 2001).

3.2. Mecanismos de Transporte através da BHE

A passagem de substâncias através da BHE pode ser dividida, de maneira geral, em duas grandes vias:

(a) Via paracelular: Através dessa via íons e moléculas atingem o parênquima cerebral difundindo-se através das junções celulares presentes no endotélio, de acordo com um gradiente de concentração (WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

(b) Via transcelular: É uma via que envolve mecanismos de difusão passiva ou facilitada de compostos, endocitose mediada por receptores, processos de transcitose e processos mediados por transportadores. As moléculas alcançam o parênquima cerebral cruzando através das células do endotélio (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014).

O balanço entre essas duas grandes vias de entrada de compostos no SNC é extremamente importante, afim de que haja um controle preciso de toda permeabilidade transendotelial. Os principais mecanismos envolvendo essas duas vias de transporte de substâncias estão esquematizados na Figura 3.

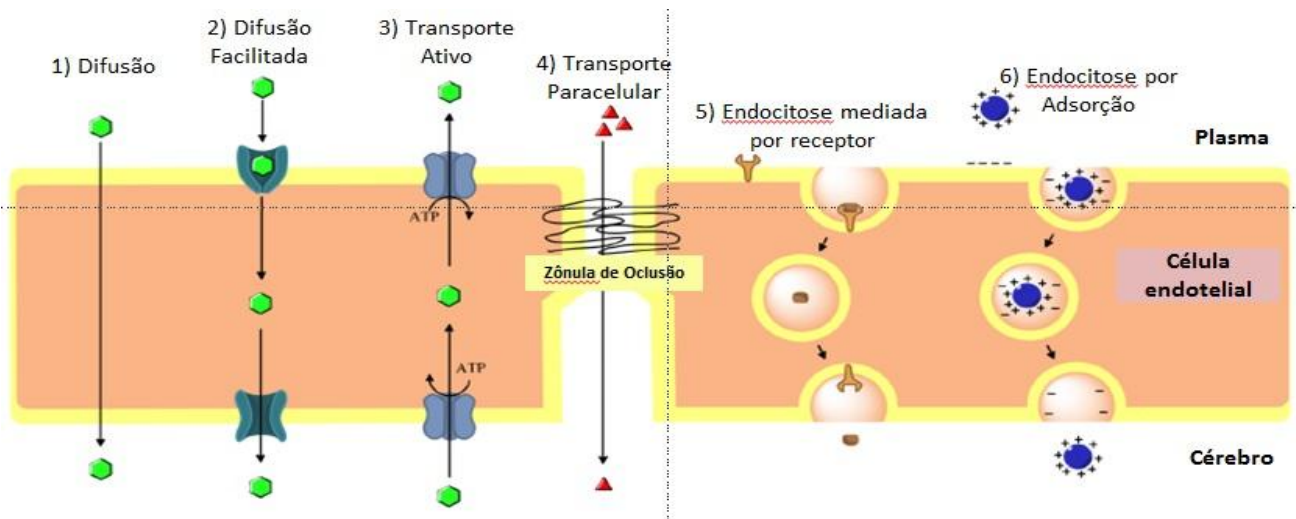


Figura 3. Principais mecanismos de transporte de substâncias através da barreira hematoencefálica (Adaptado de Sanchez-Covarrubis, 2014).

Pequenas moléculas lipofílicas como o oxigênio, o gás carbônico e o etanol conseguem alcançar o SNC através de difusão pelas membranas que compõe as barreiras enquanto que moléculas hidrofílicas (ex: peptídeos e proteínas) necessitam de transportadores específicos para atingirem o parênquima cerebral.

Sendo assim, um elaborado sistema de transporte de substâncias como o transportadores de glicose (GLUTs), os transportadores da família ABC, e os carreadores de solutos orgânicos (CSO) são expresso nas membranas luminal e abluminal das células endoteliais que compõe a BHE (GABATHULER, 2010).

3.2.1. Difusão Passiva

O processo de difusão passiva é um dos mecanismos mais simples de transporte através da BHE e envolve a passagem de solutos através das membranas das células a favor de gradiente de concentração, sem o envolvimento de proteínas carreadoras ou gasto energético para as células. Os esteroides sintéticos, os opióides como a morfina e a heroína e a difenilhidramina são alguns exemplos de fármacos que possuem a capacidade de se difundir passivamente através da BHE (PARDRIDGE, 2012; TUNBLAD; JONSSON; HAMMARLUND-UDENAES, 2003).

Uma série de fatores influencia a habilidade de uma substância difundir-se passivamente através das barreiras do sistema nervoso central: área superficial para difusão, concentração no sangue, lipofilicidade, polaridade e tamanho da molécula (NAU; SÖRGEL; EIFFERT, 2010). A lipofilicidade de uma substância correlaciona-se direta e proporcionalmente com a capacidade de permear membranas celulares. Quanto mais lipossolúvel uma substância, maior a sua capacidade de alcançar o tecido nervoso central (LIU; TESTA; FAHR, 2011). Entretanto, o tamanho de uma molécula também pode interferir na difusão através de membranas biológicas. Sendo assim, comparando-se duas moléculas com mesma lipofilicidade porém com tamanhos diferentes, a menor delas se difundirá com maior velocidade através das células que compõe a UNV e alcançará o tecido cerebral em menor tempo (PARDRIDGE, 2012).

Outro importante fator que deve ser considerado ao se estudar o processo de difusão passiva através da BHE é a capacidade de formação de ligações de hidrogênio de um composto. Compostos que possuem grande quantidade de

ligações de hidrogênio entre suas moléculas possuirão maior dificuldade de difusão passiva através das células (MUEHLBACHER et al., 2011).

Geralmente substâncias polares e hidrofílicas não possuem a capacidade de se difundir passivamente através das membranas biológicas presentes no organismo. Todavia, íons e pequenas moléculas polares (ex: a molécula de água) chegam ao cérebro através de canais de água (ex: aquaporinas) que atravessam a bicamada lipídica das membranas biológicas e estão distribuídos ao longo da microvasculatura que recobre o parênquima cerebral (FRANCESCA; REZZANI, 2010).

3.2.2. Mecanismos de Difusão Facilitada

O transporte de compostos através de difusão facilitada envolve a interação do substrato com uma proteína carreadora presente, por exemplo, na membrana plasmática das células que compõem a UNV, permitindo assim que a substância permeie a BHE a favor de um gradiente de concentração. Esse tipo de mecanismo de transporte regula o fornecimento de nutrientes essenciais para a sobrevivência dos neurônios, como, por exemplo, a glicose, bem como permite a eliminação de compostos produzidos pelo metabolismo cerebral.

O exemplo clássico carreador de membrana é o transportador de glicose - 1 (GLUT-1) que está localizado tanto na membrana luminal quanto na membrana abluminal da BHE e sua velocidade de difusão facilitada é dependente da concentração de glicose circulante na corrente sanguínea (DEVRAJ et al., 2011)

Além disso, normalmente a difusão facilitada ocorre através de um mecanismo de co-transporte, onde uma substância (ex: íons monovalentes) é transportada no sentido inverso ao do substrato primário carregado pelo transportador (ABBRUSCATO et al., 2004; SUN; LYTLE; O'DONNELL, 1997).

Um exemplo de fármaco que utiliza o mecanismo de difusão facilitada é a levodopa. O transporte da L-Dopa é mediado pelo transportador de aminoácidos neutros tipo 1 (LAT-1) (STENEHJEM et al., 2009).

3.2.3. Endocitose

A endocitose permite o transporte de substâncias do meio extracelular para o intracelular utilizando-se de vesículas endocíticas, que são formadas por invaginações da membrana plasmática, seguida de fusão e separação de um segmento da mesma.

Durante o processo de endocitose, macromoléculas ou até mesmo partículas constituídas por agregados moleculares podem ser transportadas através da BHE via endocitose mediada por receptores, mecanismos de adsorção ou endocitose de fase fluída.

A endocitose mediada por receptores envolve a interação de um substrato com receptores que são expressos na superfície externa da membrana celular. A interação entre o receptor e seu substrato desencadeia a invaginação da membrana luminal da célula e a internalização do complexo receptor-substrato para o meio intracelular, onde ocorre então a dissociação do substrato de seu receptor. A vesícula endocítica formada pode ainda atravessar o citoplasma celular e fundir-se com a membrana abluminal permitindo assim, a liberação do substrato diretamente no parênquima cerebral (PARDRIDGE, 2012). O transporte de íons ferro, carregados pela transferrina, e de insulina para o SNC ocorre através de endocitose mediada por receptores (FISHMAN et al., 1987)

Na endocitose adsortiva, proteínas catiônicas adsorvem-se à membrana luminal dos capilares da BHE através de interações eletrostáticas com sítios aniônicos, formados principalmente pela expressão de glicoproteínas ácidas (ex: glicocálix), presentes na membrana plasmática e são então internalizadas (SCHERRMANN, 2002; TAMAI; TSUJI, 2000; TSUJI, 2005).

Por outro lado, a endocitose de fase fluída não requer a presença de receptores de membrana e envolve a captação de compostos que estejam solúveis no fluído extracelular. Envolve a cooperação entre clatrin, caveolinas e o citoesqueleto celular para a deformação da membrana da célula, formação das vesículas e internalização do meio extracelular. Da mesma forma que na endocitose mediada por receptores as vesículas podem liberar o conteúdo

internalizado no citoplasma, ou ainda, no líquido intersticial do tecido nervoso, após fusão com a membrana abluminal da célula (ABBOTT, 2005; SIMIONESCU; GAFENCU; ANTOHE, 2002).

3.2.4. Transporte Ativo

O transporte ativo de substâncias através da BHE permite o movimento de moléculas contra seu gradiente de concentração e envolve o gasto de energia na forma de ATP. Diversos transportadores dependentes de energia são expressos nas membranas luminal e abluminal do endotélio dos capilares cerebrais e são os principais responsáveis pelo transporte de íons, nutrientes e componentes endógenos para o parênquima cerebral (HAWKINS et al., 2006; ABBOTT et al., 2010).

É esse tipo de transporte o responsável por restringir e regular a entrada de substâncias exógenas no SNC. Uma série de compostos farmacologicamente ativos, incluindo analgésicos opioides, glicosídeos cardiotônicos, fármacos antineoplásicos, antibióticos e bloqueadores de canais de cálcio utilizam o transporte ativo para alcançarem concentrações efetivas no tecido cerebral (HENTHORN et al., 1999; SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014).

3.3. Expressão de Transportadores de Influxo e Efluxo nas Barreiras do Sistema Nervoso Central

A grande maioria dos compostos farmacologicamente ativos de ação central são internalizados ou exocitados do cérebro por meio de proteínas transportadores expressas nas barreiras do SNC (TSUJI, 2005).

Nos últimos anos, uma série de transportadores de efluxo e de influxo foram identificados incluindo os transportadores da família ABC (*ATP-binding cassette*), a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRPs), proteínas associada a resistência a multidrogas (MRPs), transportadores orgânicos de

cátions e ânions, transportadores de peptídeos e nucleotídeos entre outros (Figura 4).

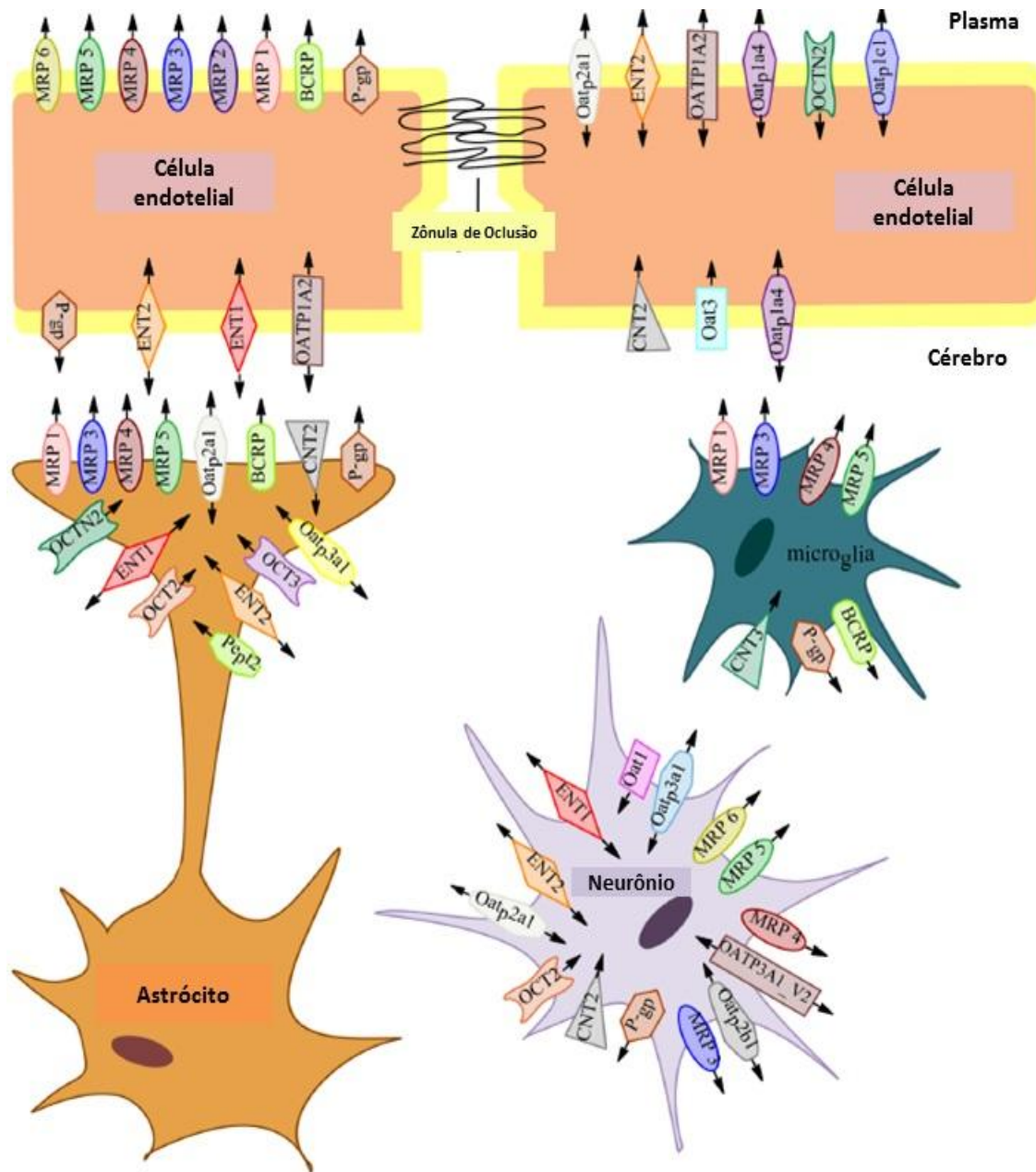


Figura 4. Principais transportadores de efluxo e influxo expressos nos componentes da unidade vascular cerebral (Adaptado de Sanchez-Covarrubias, 2014)

3.3.1. Principais transportadores de efluxo expressos na BHE

3.3.1.1 Glicoproteína- P (P-gp)

A P-gp é uma proteína transportadora com aproximadamente 170kDa responsável pelo efluxo de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular e codificada pelo gene MDR. Atualmente, duas isoformas desse gene foram identificadas no tecido de seres humanos: o gene MDR-1 e o gene MDR-2. No tecido de roedores a expressão de P-gp é regulada por três isoformas do gene *mdr* denominadas: *mdr-1a*, *mdr-1b* e *mdr-2*.

A superexpressão dos genes MDR-1/*mdr-1a*/*mdr-1b* é a principal responsável pelo surgimento do fenótipo MDR tanto em humanos quanto em roedores. Já os genes MDR-2/*mdr-2* são expressos principalmente no tecido hepático e estão relacionados com o transporte hepatobiliar de fosfatidilcolina.

Os primeiros estudos que evidenciaram a presença da glicoproteína-P foram realizados por Ling e colaboradores (1978) após identificarem que células tumorais de ovário de hamster chineses eram resistentes à colchicina. Desde então, a presença de P-gp já foi evidenciada em diversos tecidos incluindo rins, fígado, testículos, placenta e trato gastrointestinal.

No tecido cerebral a P-gp é expressa principalmente na membrana luminal e abluminal do endotélio da BHE e na membrana apical das células epiteliais do plexo coriódico. Além disso, a P-gp também pode ser encontrada em outros componentes da UVN como astrócitos, microglia e alguns neurônios (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003). A expressão da P-gp no SNC tem como função principal proteger os neurônios de xenobióticos potencialmente neurotóxicos e manter a homeostase para o funcionamento dos neurônios.

O papel relevante da P-gp para o SNC tem se tornado cada vez mais evidente na literatura, principalmente na última década. Geyer e colaboradores (2012) estudaram uma mutação no gene MDR-1, em cães da raça Collie, que provoca uma diminuição da expressão de P-gp, especialmente em animais

homozigotos, causando neurotoxicidade à ivermectina e a doramectina, sendo necessário um ajuste de dose durante o tratamento para evitar a morte do animal.

Elmshäuser e colaboradores (2015), utilizando camundongos, demonstraram um aumento significativo da penetração cerebral de emodepside, um composto semi-sintético derivado de uma substância produzida pelo fungo *Mycelia sterilia* nos animais *knockout* para o gene *mdr-1* com comprometimento neurológico, concluindo que a P-gp restringe a penetração do emodepside protegendo o SNC dos camundongos das concentrações neurotóxicas desse fármaco.

A P-gp possui uma vasta gama de substratos, sendo portanto, um grande obstáculo para o desenvolvimento de fármacos para tratamento de doenças do SNC. Esse número de substratos tende a crescer cada vez mais, a medida que novos estudos são realizados com esse transportador (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003). É possível agrupar as principais características que uma molécula deve apresentar para que seja substrato da P-gp, entretanto, essa não é uma regra. Normalmente, os substratos desse transportador são compostos apolares, anfipáticos e que possuem peso molecular variado como por exemplo a daunorubicina (564 Da) e a actinomicina D (1255 Da) (PALMEIRA et al., 2012).

As categorias de substratos da P-gp em roedores incluem: bloqueadores dos canais de cálcio, antibióticos, glicosídeos cardíacos, quimioterápicos, imunossupressores, anti-epiléptico, antipsicóticos, inibidores de proteases e antidepressivos, entre outros (Quadro 1). Os principais substratos endógenos da P-gp incluem citocinas, lipídeos, hormônios e esteroides (PALMEIRA et al., 2012)

Além disso, existem uma série de inibidores competitivos da P-gp, como por exemplo, o verapamil, a clorpromazina, a ciclosporina A, e o valsopodar, entre outros. Os inibidores da hidroximetil glutaril CoA (HMG-CoA) redutase possuem a capacidade de bloquear a função de transporte da P-gp e esforços têm sido empregados na tentativa de utilizar esse fármaco para diminuir a função e/ou reduzir a expressão dessa proteína permitindo, assim, desenvolver-se novas tecnológicas para *delivery* cerebral de compostos (VARMA et al., 2011).

Quadro 1. Exemplos de substratos e inibidores competitivos da glicoproteína-P

Classe Farmacológica	Fármacos
Antitumorais	Paclitaxel, doxorubicina, vimblastina,
Antimicrobianos	Eritromicina, levofloxacino, ofloxacino
Anticonvulsivantes	Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital
Inibidores da HMG-CoA redutase	Atorvastatina, lovastatina
Antieméticos	Ondasetron
Antihistamínicos-H ₁	Fexofenadina, terfenadina
Bloqueadores dos canais de cálcio	Diltiazem, verapamil
Diversos	Probenecida, amitriptilina, colchicina

Adaptado de Cascorbi e Haenisch, 2010.

3.3.1.2. Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) e proteína associada à multirresistência aos fármacos (MRPs)

Até o momento, as BCRPs (em humanos) e bcrps (em roedores) são a mais recente família de transportadores ABC identificados (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). Foram descritas pela primeira vez por Doyle e colaboradores (1998) a partir de uma linhagem celular de câncer de mama resistente a doxorubicina (MCF-7 /AdrVp) e, de acordo com sua estrutura e homologia de sequência pertencem a subfamília de transportadores ABCG, sendo denominadas pelo comitê de nomenclatura do genoma humano: ABCG2 (STAUD; PAVEK, 2005).

As BCRPs/bcrps são proteínas expressas em diversos tecidos tanto em humanos quanto em roedores incluindo o trato gastrintestinal, fígado, placenta e testículos. No SNC, são encontradas na membrana luminal do endotélio vascular cerebral e também nos astrócitos e na microglia. Estudos realizados por Fujiyoshi (2007) identificaram, no plexo coriódio de roedores, níveis de RNA mensageiro (mRNA) que indicam que há expressão de proteínas da família ABCG2 também nesse local.

BCRP/bcrp possui uma alta capacidade de efluxo de moléculas com diferentes características físico-químicas, afetando diretamente parâmetros farmacocinéticos como a absorção e biodisponibilidade e *clearance* renal e hepático, principalmente de antitumorais como a mitoxantrona, metotrexato e da cimetidina, um fármaco antiemético. Entretanto, a funcionalidade dessa proteína na BHE ainda é questionada (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014).

Um estudo realizado com o fármaco imantinib, um substrato para bcrp em roedores, demonstrou uma redução no *clearance* do composto em cerca de 1,6 vezes nos camundongos bcrp *knockout* quando comparado aos camundongos controle e uma penetração cerebral significativamente aumentada, cerca de 2,5 vezes, duas horas após a administração do composto. A administração concomitante com elacridar, um inibidor de bcrps, aumentou a penetração cerebral do imantinib nos animais do grupo controle, evidenciando assim que o efluxo cerebral desse antineoplásico é mediado por bcrps expressas no endotélio cerebral (BREEDVELD et al., 2005)

A identificação e caracterização da bomba de efluxo representada pela proteína de multirresistências a fármacos (MRP/mrp) pertencente a subfamília de transportadores ABCC foi realizada por Cole e colaboradores após clonagem do gene MRP1 (ABCC1) de humanos (COLE, 2014).

O papel principal da MRP (em humanos), mrp em roedores, é o efluxo de xenobióticos do meio intracelular para o meio extracelular, normalmente, a corrente sanguínea. Sua expressão é a responsável, juntamente com a P-gp, pelo fenótipo de multirresistência (COLEY et al., 2002; SCHUURHUIS et al., 1995). Atualmente foram identificadas 12 isoformas de MRPs sendo 9 homólogos dessa proteína (MRP1-MRP9), os principais representantes da subfamília ABCC de transportadores.

A principal diferença entre a MRP/mrp e a glicoproteína-P está no tipo de substrato transportado, sendo a MRP tanto em humanos quanto em roedores mais seletiva do que a P-gp, atuando como bomba de efluxo principalmente para ânions orgânicos e metabólitos sulfatados ou conjugados com a glutatona celular (ENGIDAWORK et al., 2001)

Atualmente, sabe-se que a expressão de múltiplas isoformas de MRPs na membrana luminal do endotélio dos capilares cerebrais é fundamental para o efluxo de fármacos do parênquima cerebral para o sangue sistêmico, sendo as isoformas Mrp1 e Mrp3 e Mrp5 as mais expressas em roedores (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

3.3.2. Principais Transportadores de Influxo Expressos na BHE

3.3.2.1 Superfamília dos carreadores de solutos orgânicos (SLC)

A superfamília de SLC compreende as principais proteínas transportadores de pequenas moléculas aniônicas e catiônicas, bem como peptídeos e nucleotídeos, através das membranas biológicas dos mamíferos (HAGENBUCH; MEIER, 2004; HEDIGER et al., 2004).

Existem atualmente 43 subfamílias distintas dessas proteínas descritas e caracterizadas na literatura (SLC1-SLC43) sendo que as proteínas das famílias SLC15A1, SLC21A, SLC22, SLC28 e SLC29 são as principais expressas na BHE e na BHL. Os principais representantes das famílias SLC21 e SLC22 incluem os transportadores de ânions (OATs/Oats) e cátions (OCTs/Octs) orgânicos e os polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs/Oatps) (HAGENBUCH; MEIER, 2004) Enquanto que os transportadores de nucleosídeos e peptídeos pertencem às subfamílias SLC28, SLC29 e subfamília SLC15A1, respectivamente. Os transportadores SLCs apresentam transporte bidirecional de substâncias através da membranas biológicas, entretanto, normalmente atuam favorecendo a captação de compostos para o meio intracelular (transporte de influxo) (BOSTRÖM; SIMONSSON; HAMMARLUND-UDENAES, 2006; SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

Diferente dos transportadores da superfamília ABC, que tem uma demanda energética para realizar o transporte de substâncias através das membranas, os SLCs utilizam-se de gradientes eletroquímicos (ex: gradiente de Na⁺ ou H⁺) ou gradiente de concentração estabelecidos pelos solutos que estão sendo

transportados. Sendo assim, o mecanismo de transporte realizado por essas substâncias é denominado transporte ativo secundário (HEDIGER et al., 2004)

A Tabela 1 resume os principais substratos e inibidores das proteínas que fazem parte da superfamília dos carreadores de solutos orgânicos.

Tabela 1. Exemplos de substratos e inibidores da superfamília de solutos orgânicos.

Substratos	Km (μM)	Inibidores	IC₅₀ (μM)
Atorvastatina	12.4	Carbamazepina	188
Levofloxacino	136	Cetoconazol	19.2
Fluvastatina	7.0	Probenecida	1.3
Rosuvastatina	9.8	Rifamicina	2.0
Telmisartam	0.8	Quinidina	9.0
Glibenclamida	6.3	Cefazolina	1740.0
Metotrexato	457	Verapamil	2.6
Valsartan	1.39	Ciclosporina	2.2

Adaptado de (HAGENBUCH; MEIER, 2004; KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012)

Dentre os principais compostos identificados como inibidores das proteínas da superfamília de solutos orgânicos é necessário destacar o papel da probenecida na investigação do papel dessa superfamília no transporte através da BHE. A probenecida é um agente uricosúrico inibidor da secreção tubular da maioria das penicilinas e cefalosporinas, potencializando o efeito desses β -lactâmicos, que tem sido empregada como um inibidor de transportadores da superfamília de solutos orgânicos e também de MRPs em uma série de estudos publicados na literatura (CHEN et al., 2014; GARLAND et al., 2008; MARCHAND et al., 2006; TUNBLAD; JONSSON; HAMMARLUND-UDENAES, 2003).

3.3.2.2. Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs/Oatps)

Os polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos OATPs (humanos) oatps (roedores) representam a maior subfamília de SLCs atualmente identificados (HAGENBUCH; MEIER, 2004). Esse grupo de transportadores está envolvido no transporte transcelular de diversas substâncias modulando principalmente a absorção, distribuição e excreção de xenobióticos.

O mecanismo de transporte através das membranas biológicas é independente de co-transporte de sódio ou gasto de energia na forma de ATP, sendo, portanto, necessário que se estabeleça um gradiente eletroquímico utilizando, por exemplo, o co-transporte de conjugados de glutatona ou bicarbonato intracelular como força motriz para que o substrato sofra influxo para o meio intracelular. Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo conclusivo foi publicado demonstrando qual é a exata força motriz para o funcionamento desse sistema de transportadores (HEDIGER et al., 2004).

A função desses transportadores é extremamente dependente do pH extracelular, sendo esse um fator determinante para o sucesso no influxo de substâncias. Um estudo realizado *in vitro* por Varma e colaboradores (2011) avaliou o papel do OATP2B1 na absorção intestinal e distribuição tecidual de uma série de estatinas, em diferentes pHs, utilizando células Caco-2 e concluiu que esse transportador exerce um papel importante na captação da rosuvastatina e da fluvastatina, porém, a pravastatina é substrato apenas em pHs ácidos. Esses resultados têm uma importante relevância clínica já que o OATP2B1 é expresso no intestino delgado e a variação do pH nessa região pode influenciar a biodisponibilidade de substratos desse transportador.

Além disso, OATP2B1 é expresso no tecido que compõe as barreiras cerebrais e pode alterar a penetração de substâncias no SNC em resposta a variações de pH no sangue circulante, devido, principalmente a alterações da homeostase do organismo em quadros de acidose ou alcalose metabólica, por exemplo (SAI et al., 2006).

Das 36 principais isoformas de OATP/Oatps identificadas as principais expressas nas barreiras que compõe o SNC são: Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1a5, Oatp1c1 and Oatp2a1 em roedores e OATP1A2, OATP1C1 AND OATP2B1 em seres humanos, sendo seus principais substratos moléculas orgânicas anfifílicas que possuem em sua estrutura química polaridades distintas, sendo capazes de promover interação com meios de polaridades diferentes (ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012)

A expressão e a caracterização desses transportadores na BHE de roedores está bem estabelecida e descrita em diversos trabalhos publicados enquanto que em humanos a identificação desses transportadores permanece controversa. Sendo assim, optou-se, nessa revisão bibliográfica, pela descrição dos principais transportadores presentes na BHE de roedores (Oatp1a1, Oatp1a4 e Oatp1a5) (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

O transportador Oatp1a1 é uma proteína de 670 aminoácidos expressa em diversos tecidos incluindo o cérebro de ratos e camundongos. Foi identificado inicialmente no fígado de ratos e posteriormente na BHE. Através de técnicas de avaliação de mRNA sua expressão foi evidenciada também em células do plexo coriódio na BHL. Os principais substratos desse transportador são sais biliares, cátions e ânions orgânicos endógenos e fármacos como a pravastatina e fexofenadina. (HAGENBUCH; MEIER, 2004, p. 1)

O transportador Oatp1a4 é uma proteína formada por 661 aminoácidos expressa na membrana luminal e abluminal do endotélio vascular do cérebro e do plexo coriódio de roedores. Os principais substratos desse transportador incluem fármacos opióides analgésicos, inibidores da enzima HMG-CoA redutase, sais biliares e hormônios. Juntamente com os transportadores Oatp1a1 e Oatp1a5 essa proteína é a responsável pela captação e influxo do hormônio tireoideano para o SNC (VARMA et al., 2011)

Outro importante transportador expresso na BHE e também na BHL de roedores é a proteína denominada Oatp1a5 formada por 670 aminoácidos e seus principais substratos incluem sais biliares, hormônios tireoideanos e esteroides conjugados. Além disso, esse transportador, assim como o transportador Oatp1a4,

pode ser expresso no sentido oposto da membrana e contribuir para o efluxo de substâncias do tecido cerebral (YARIM et al., 2005)

3.3.2.2. Transportadores de ânions orgânicos (OATs/Oats)

Os transportadores de ânions orgânicos, OAT (humanos) e Oats (roedores), são os representantes da família 22 da superfamília SLC (SLC22A). Os principais representantes dessa família são os OATs/Oats 1-6 e os transportadores renais específicos (RST) (ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012).

O influxo de substâncias mediado por OATs/Oats pode ser, ou não, dependente de íons sódio e em alguns casos envolve gasto energético. Os substratos para essa família de transportadores normalmente são moléculas de baixo peso molecular carregadas negativamente no pH fisiológico do sangue (em torno de 7.4) (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

Estudos têm demonstrado que o transportador Oat-3 possui um importante papel no transporte de metabólitos aniônicos de neurotransmissores como a epinefrina, a norepinefrina, a dopamina e a serotonina (ERDMAN et al., 2006). Esse transportador é expresso ainda na membrana basolateral e apical das células do endotélio vascular cerebral de roedores permitindo assim o transporte bidirecional de substâncias (sangue-cérebro e cérebro-sangue). O Oat-3 tem sido o transportador orgânico mais estudado como potencial alvo para aumentar o *delivery* de compostos farmacologicamente ativos para o SNC (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

3.3.2.3. Transportadores de cátions orgânicos (OCTs/Octs)

As substâncias que no pH fisiológico possuem cargas elétricas não possuem a habilidade de atravessar a grande maioria das membranas biológicas através de mecanismos de difusão e, por isso, necessitam de mecanismos específicos de transporte transcelular.

Os transportadores de cátions orgânicos são uns grupos de proteínas pertencentes à superfamília SLC22A que são classificados de acordo com o tipo de substrato que transportam. Os OCTs oligoespecíficos são um conjunto de proteínas capazes de facilitar o transporte de um substrato específico e seus análogos atuando principalmente na transferência de neurotransmissores, vitamina B1 e no transporte vesicular e citoplasmático da colina, que é utilizada no SNC como precursor do neurotransmissor acetilcolina. Os OCTs poliespecíficos são capazes de transportar cátions com diferentes configurações estruturais e químicas (ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012; SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

Esse sistema de transportadores pode ainda ser dependente do gradiente de prótons (H^+) presente nas células e são denominados OCTN1-2 (em humanos) Octn1-3 (em roedores). Os transportadores independentes de H^+ (OCT/Oct1-3) têm se mostrado responsáveis pelo influxo de substratos para o meio intracelular, enquanto que aqueles dependentes de um gradiente eletroquímico (OCTN1-2/Octn1-3) regulam o efluxo de várias substâncias catiônicas para o meio extracelular (JONG et al., 2011)

No SNC o OCT/Oct1-3 tem sua expressão majoritária na membrana basolateral das células do endotélio vascular cerebral e do plexo coriáide e atuam regulando a penetração e distribuição de fármacos como a lamotrigina no tecido cerebral. Além disso, estudos realizados *in vitro* utilizando células do endotélio vascular cerebral de ratos (linhagem celular TR-BBB13) evidenciou o papel de um transportador orgânico de cátions na captação cerebral de oxicodona (OKURA et al., 2008).

Somente duas isoformas de OCTN foram identificadas em humanos, OCTN1 e OCTN2, enquanto que em roedores foram identificadas a expressão de 3 isoformas distintas, sendo Octn1 o principal transportador expresso na medula espinhal, no plexo coriáide, no hipocampo, no córtex e no cerebelo de roedores. Seus principais substratos exógenos identificados são quinidina, nicotina, cimetidina e clonidina (TAMAI et al., 1997, 1998)

3.4. *Delivery* de Compostos Farmacologicamente Ativos para o SNC

As doenças neurológicas têm, cada vez mais, se configurado como um problema de saúde pública, uma vez que representam não apenas um problema médico mas, também um problema social e econômico.

Estima-se que aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas em todo mundo sofrem com algum tipo de doença que afeta o SNC, entre elas destacam-se o Mal de Parkinson, a doença de Alzheimer, doenças neurovasculares, epilepsia, e tumores cerebrais, entre outras (PALMER, 2010).

Apesar do exponencial avanço da neurociência na atualidade, com a compreensão dos mecanismos patológicos das doenças que acometem o SNC, a identificação de diversos alvos terapêuticos no tecido cerebral e a descoberta de potenciais compostos farmacologicamente ativos através de ferramentas de química combinatória e *screening* computacional, o desempenho farmacocinético e farmacodinâmico de moléculas *leads* têm sido insatisfatório devido as limitações impostas pelas barreiras presentes no SNC (LEMAIRE; DESRAYAUD, 2005)(LEMAIRE; DESRAYAUD, 2005).

Dessa forma, uma série de estratégias têm sido estudadas, sendo algumas utilizadas na clínica, na tentativa de melhorar a penetração de compostos no tecido cerebral e obter resultados satisfatórios no tratamento de doenças do SNC (LEMAIRE; DESRAYAUD, 2005). A revisão dessas estratégias não faz parte do escopo desse trabalho, entretanto, as principais delas serão destacadas a seguir.

As técnicas invasivas foram as primeiras estratégias desenvolvidas para o *delivery* cerebral de compostos no SNC. As substâncias administradas não precisam atravessar as barreiras biológicas impostas pelo SNC e podem exercer seu efeito diretamente no local de ação, permitindo uma administração direcionada (STENEHJEM et al., 2009).

Tamargo e colaboradores (2002), utilizando um modelo de epilepsia induzida por cobalto em ratos, demonstraram que a utilização de um implante polimérico para liberação controlada de fenitoína no cérebro dos animais resultou em uma significativa redução das crises convulsivas, sem o surgimento de efeitos

tóxicos ou alterações comportamentais evidentes. Nesse trabalho os autores apresentam como vantagens da utilização desses tipos de implantes poliméricos, o *delivery* cerebral de substâncias que possuem eficácia antiepiléptica comprovada *in vitro* porém baixa penetração através da BHE ou alta toxicidade sistêmica. Porém, nenhuma estratégia foi mencionado para eliminação ou reposição do dispositivo polimérico após a liberação completa do fármaco no tecido cerebral, o que pode se tornar um grande problema em tratamentos crônicos de crises convulsivas.

Apesar de parecerem promissores o *delivery* cerebral direto ou a infusão contínua de substâncias no SNC pode causar uma série de efeitos indesejáveis. Além disso, como necessitam de um procedimento cirúrgico para sua implantação, são estratégias de alto custo e podem causar alterações fisiológicas na BHE, na expressão de transportadores no endotélio da vasculatura cerebral, bem como, aumentar a suscetibilidade do SNC a infecções (BARCIA; GALLEGO, 2009; LU et al., 2014; PATHAN et al., 2009).

Uma vez que o cérebro necessita de uma série de substâncias essenciais para a manutenção da homeostase como a glicose, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), insulina e hormônios produzidos fora do SNC é possível realizar o chamado “*delivery* mediado por transportadores” através do desenvolvimento de fármacos capazes de mimetizar uma substância endógena que é reconhecido por proteínas transportadoras expressas na BHE, sendo então internalizado.

Esse tipo de estratégia já tem sido utilizada na clínica com benefícios consideráveis, por exemplo, para o tratamento do Mal de Parkinson com o precursor da dopamina, L-Dopa, mediado pelo transportador de aminoácidos neutros expresso na BHE (DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008; NGWULUKA et al., 2010)

Outra maneira de aumentar o *delivery* cerebral de fármacos é diminuir o efeito das bombas de efluxo, especialmente a P-gp, nas barreiras do SNC e uma série de inibidores farmacológicos dessas proteínas tem sido estudados com o objetivo de melhorar a penetração de compostos farmacologicamente ativos no parênquima cerebral (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014).

A primeira geração de compostos capazes de modular os efeitos da P-gp foram identificados no final da década de 80 (THOMAS; COLEY, 2003), sendo os principais representantes dessa classe o verapamil, a ciclosporina A e a quinidina (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014; THOMAS; COLEY, 2003). Apesar de apresentarem bons resultados clínicos, contribuindo com aumentando da penetração de substratos de P-gp no SNC, a dose desses compostos necessária para obter efeito é muito alta, resultando em efeitos tóxicos e interações farmacocinéticas não desejadas no organismo (ENDRES et al., 2006).

Os moduladores de segunda geração, como o PSC833 (valsopodar), o dexverapamil e o brircodar (VX-710), são inibidores mais potentes dessa bomba de efluxo, necessitam de menores doses e, portanto são menos tóxicos para o organismo (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). Porém, esses compostos apresentaram importantes efeitos citotóxicos e interações farmacocinéticas (PALMEIRA et al., 2012).

Coley e colaboradores (COLEY et al., 2000) demonstraram que o tratamento com 1 nM de valsopodar, em tecidos de sarcomas retirado de pacientes, resultou em um efeito moderado (aproximadamente 20%) no acúmulo de antraciclina, nas amostras positivas para a expressão de P-gp. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, os resultados obtidos com linhagem celular de epitélio de câncer ovariano que expressam P-gp, os resultados da inibição com o valsopodar foram semelhantes e em conjunto esses estudos colaboram para o entendimento do fracasso clínico desse composto (COLEY et al., 2002).

Os moduladores de P-gp de terceira geração são moléculas que possuem uma alta seletividade e potência na inibição dessa proteína e foram desenvolvidas utilizando-se principalmente de ferramentas de química combinatória e de relação estrutura-atividade (THOMAS; COLEY, 2003). Os principais moduladores de terceira geração, utilizando em ensaios clínicos, incluem o tariquidar (XR576), o zosuquidar (LY335979) e o laniquidar (R101933), sendo o mais promissor deles o tariquidar que se liga fortemente a P-gp impedindo o funcionamento dessa bomba de efluxo (PALMEIRA et al., 2012; THOMAS; COLEY, 2003).

Ao longo dos últimos anos, a grande maioria das estratégias envolvendo o desenvolvimento de fármacos para o sistema nervoso central têm se concentrado em identificar mecanismos que impedem os compostos de entrarem no sistema nervoso central e encontrar alternativas para transpô-los (RONALDSON; DAVIS, 2013). Por exemplo, o desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo ou a modulação de vias de sinalização celular que reduzam ou evitem a expressão de proteínas da família ABC na BHE (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014)

Entretanto, recentemente os esforços estão sendo direcionados para identificação de substâncias que sejam substratos de proteínas de transporte facilitadoras do influxo através da BHE como os Oatps, Oats e Octs (RONALDSON; DAVIS, 2013).

O mecanismo de transporte cerebral de uma série de compostos, como peptídeos analgésicos opióides, substâncias para o tratamento de hipóxia cerebral, opióides analgésicos não peptídicos, têm disso explicado através da utilização desses carreadores (HAGENBUCH; MEIER, 2004). Sendo assim, essas rotas podem ser exploradas, por exemplo, para o desenvolvimento de análogos capazes de serem reconhecidos pelos transportadores de influxo, melhorando assim, a farmacoterapia para doenças do SNC, evitando, por exemplo a necessidade da utilização de inibidores de efluxo, que podem ser tóxicos ou provocar interações farmacológicas importantes nos organismos (RONALDSON; DAVIS, 2013; SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014).

3.5. Carreadores Coloidais de Fármacos para *Delivery* Cerebral

Colóides ou sistemas coloidais são misturas que contêm partículas em suspensão com diâmetro entre 1 e 1000 nanômetros (KREUTER, 2001; LU et al., 2014). Os principais exemplos de dispersões coloidais que têm sido estudados como carreadores de fármacos são os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, os dendrímeros e as nanopartículas poliméricas (WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

Devido às propriedades físico-químicas, tamanho reduzido e estabilidade na circulação sistêmica essas formulações têm demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, boa capacidade de distribuição e permeação de membranas biológicas, incluindo a BHE, através de mecanismos de endocitose e transocitose (LU et al., 2014).

Estudos pré-clínicos em modelos de tumores cerebrais, encefalopatia causada pelo vírus HIV e Alzheimer demonstraram bons resultados farmacológicos quando da utilização de formulações do fármaco em sistemas coloidais como nanopartículas e lipossomas (BHASKAR et al., 2010; WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

Além disso, o *delivery* de fármacos para o cérebro pode ser aumentado e direcionado utilizando-se, por exemplo, a conjugação dos sistemas coloidais com substratos de receptores presentes na superfície das células que formam a BHE. Essa estratégia torna o colóide alvo-específico, aumentando a concentração do fármaco no sítio de ação e reduzindo possíveis efeitos tóxicos causados pela distribuição sistêmica do mesmo (GAO; PANG; JIANG, 2013; LU et al., 2014).

Entre as dispersões coloidais os sistemas lipossomais são constituídos por vesículas lipídicas contendo uma ou mais bicamadas de lipídeos. Normalmente eles possuem um núcleo aquoso, permitindo a encapsulação de moléculas hidrofílicas, enquanto que compostos anfifílicos e fármacos lipofílicos podem estar solubilizados na parede lipídica (RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013).

Normalmente os lipossomas não possuem a habilidade de se manter na circulação sistêmica por muito tempo, sendo rapidamente eliminados pelo sistema retículoendotelial (SRE). No entanto, a utilização de vesículas menores que 100 nm e o revestimento da superfície com polietilenoglicol (PEG) permitem tornar essas partículas furtivas ao SER e prolongar seu tempo de circulação no organismo (LINDQVIST et al., 2013).

Uma série de modificações na superfície dos lipossomas tem sido estudada buscando aumentar a distribuição cerebral de fármacos encapsulados nesses sistemas (PARDRIDGE, 1999; SONI et al., 2008; (RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013); (LINDQVIST et al., 2013).

Hatakeyama e colaboradores (2004) revestiram a superfície de lipossomas com transferrina e polietilenoglicol e demonstraram que essas partículas, quando apresentam tamanho menor que 80 nm, são direcionadas para o cérebro e internalizadas via endocitose mediada por receptores de transferrina presentes na BHE.

Utilizando-se da fisiologia cerebral, que necessita captar glicose da circulação sistêmica, Xie e colaboradores (2012) também demonstraram que lipossomas modificados com glicose foram capazes de ser internalizados pelo cérebro via receptores do tipo GLUT.

Lindqvist e colaboradores (2013) decoraram a superfície de lipossomas peguilados com glutathione (GSH), um peptídeo capaz de ser reconhecido e internalizado na BHE através de um transportador específico, e demonstraram um aumento significativo na penetração do peptídeo opióide DAMGO no cérebro de ratos.

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são outro tipo de partícula, desenvolvidas a partir da década de 90, que podem ser utilizadas como alternativas para o *delivery* cerebral de fármacos (LU et al., 2014). Normalmente as NLS possuem tamanho entre 10 e 1000 nm, são esféricas e formadas por uma matriz polimérica estabilizada com surfactantes.

Uma série de estudos tem demonstrado a eficiência dessas partículas no *delivery* cerebral de compostos como a doxorubicina (JAIN et al., 2010) , o docetaxel (VENISHETTY et al., 2013), a quercetina (DHAWAN; KAPIL; SINGH, 2011), o atazanavir (CHATTOPADHYAY et al., 2008) e a quinina (GUPTA; JAIN; JAIN, 2007). Por serem biodegradáveis e biocompatíveis as NLSs apresentam baixa toxicidade e são passíveis de serem produzidas em larga escala, sendo, portanto, um promissor sistema carreador de fármacos para o SNC (HUANG et al., 2008).

3.5.1 Nanopartículas Poliméricas e Sua Potencial Aplicação no Delivery Cerebral de Fármacos

Nanopartículas poliméricas (NP) são dispersões coloidais aquosas que tem sido exaustivamente estudados como carreadores de fármacos para diversos sistemas do organismo (BHASKAR et al., 2010). São constituídos de um polímero biodegradável e biocompatível, normalmente poli(etileno) (PE), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(acrilamidas), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), entre outros (VENTURINI et al., 2011). Dependendo do processo de preparação e matérias-primas utilizadas as NP são divididas em dois tipos principais (Figura 7):

a) **Nanoesferas:** São sistemas monolíticos matriciais onde o fármaco encontra-se homogeneamente solubilizado (ou disperso) no interior de uma matriz polimérica, não possuindo um núcleo diferenciado (VENTURINI et al., 2011; WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

b) **Nanocápsulas:** São sistemas do tipo reservatório, com a presença de um núcleo, que pode ser líquido ou sólido, delimitado por uma parede polimérica que o isola do meio externo (VENTURINI et al., 2011; WONG; WU; BENDAYAN, 2012).

Os fármacos carreados por NPs podem ser incorporados na forma de solução ou dispersos no núcleo lipídico da partícula ou ainda, estar adsorvido ou quimicamente ligado à parede polimérica (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Vários métodos são descritos na literatura para o preparo de nanopartículas, entre os quais se destaca o método de deposição interfacial do polímero pré-formado proposto inicialmente por Fessi e colaboradores (1989). Utilizando um solvente orgânico, normalmente acetona, o polímero biodegradável, um tensoativo lipofílico (ex: monoestearato de sorbitana), o componente oleoso como triglicerídeos de cadeia média (quando for de interesse o preparo de nanocápsulas), e o fármaco são solubilizados. Essa fase orgânica é injetada, sob agitação, em uma fase aquosa que contém um tensoativo hidrofílico, geralmente

polissorbato 80 (Tween-80), ocorrendo então a difusão da fase orgânica na fase aquosa obtendo-se, de forma espontânea, as NPs.

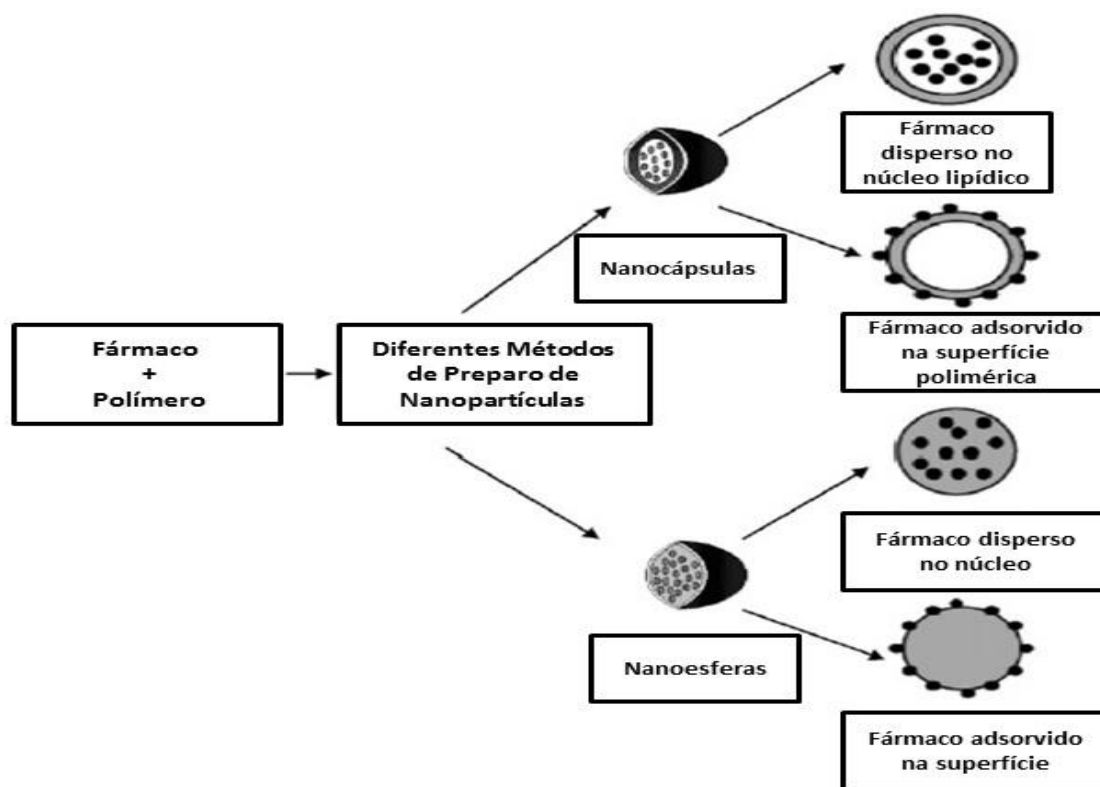


Figura 7. Tipos de nanopartículas poliméricas. De acordo com a organização estrutural as NPs são classificadas em nanocápsulas e nanoesferas e possuem semelhanças na distribuição do fármaco (Adaptado de Kumari et al. 2010)

Esse método de obtenção de NPs apresenta uma série de vantagens como simplicidade, eficiência e reprodutibilidade, obtendo-se partículas com tamanho médio entre 100 e 500 nm que apresentam elevada capacidade de encapsulação de fármacos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JÄGER et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003; VENTURINI et al., 2011). A eficiência na obtenção de NPs com população homogênea e de tamanho nanométrico é dependente de uma série de fatores como concentração do polímero, do tenso ativo e do óleo, bem como a velocidade da difusão da fase orgânica na fase aquosa (VENTURINI et al., 2011).

A estabilidade física dos sistemas nanoparticulados é determinada, principalmente, por propriedades físico-químicas como o tamanho da partícula e a distribuição das diferentes populações na formulação. Além disso, o potencial zeta, reflexo do potencial de superfície dessas partículas, é outro parâmetro importante para avaliar a estabilidade física das suspensões e também a efetividade do revestimento da superfície das NPs. Valores de potencial zeta elevados, em módulo, indicam formulações mais estáveis, pois haverá repulsão entre as partículas prevenindo agregação e precipitação (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003). O pH das formulações também deve ser avaliado, visto que alterações em seus valores podem ser indicativos de degradação do polímero ou de outros componentes da formulação ou ainda indicar contaminação microbiológica (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A utilização de polissorbato-80 na formulação confere as NPs um revestimento hidrofílico, que permite às mesmas permanecer por mais tempo na circulação sistêmica, pois não são reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) tornando-se, portanto, partículas furtivas. Além disso, a utilização do Tween-80 tem sido descrita como facilitadora da penetração cerebral das nanopartículas através da BHE, por inibir transportadores de efluxo presentes no endotélio vascular do cérebro ou promover o afrouxamento temporário das zônulas de oclusão (PATEL et al., 2012).

O mecanismo pelo qual as NPs promovem o *delivery* cerebral de substâncias ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, de acordo com as propriedades físico-químicas do carreador e a natureza das células alvo, são propostas duas principais vias de internalização: a via fagocítica e a endocitose mediada por proteínas presentes na membrana celular como caveolinas e clatrininas (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

Uma das principais dificuldades na identificação dos mecanismos pelos quais as NPs aumentam a penetração cerebral de substâncias está na complexidade dos sistemas biológicos e na ausência de modelos *in vitro* capazes de reproduzirem as condições fisiológicas necessárias para a internalização de NPs (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

3.6. Microdiálise como Ferramenta para Avaliação do *Delivery* Cerebral e Sistemas Coloidais

Uma técnica que tem se tornado cada vez mais importante no estudo de liberação e transporte de nanopartículas para o tecido cerebral é a microdiálise (MD). A MD cerebral consiste na avaliação da concentração livre tecidual de fármacos no parênquima cerebral (LINDQVIST et al., 2013). Através da implantação de uma sonda em uma região específica do cérebro e a constante perfusão dessa sonda com um fluido que simula o líquido cerebral há a criação de um gradiente de concentração que permite a difusão e a coleta, no dialisado, do fármaco livre que atingiu o tecido cerebral (HAMMARLUND-UDENAES, 2000); De (LANGE, 2013).

Sendo assim, a avaliação e comparação, utilizando a técnica de microdiálise, da concentração cerebral de fármacos livres e nanoencapsulados tem se mostrado uma ferramenta importante para o entendimento dos mecanismos de distribuição de NPs no cérebro e oferece vantagens, por exemplo, em relação à técnica de homogeneizado de tecido, uma vez que permite a determinação das concentrações livres teciduais no sítio de ação do fármaco, permitindo o planejamento de novas estratégias de *delivery* cerebral de compostos utilizando esses carreadores coloidais (HAMMARLUND-UDENAES, 2000; LINDQVIST et al., 2013).

Utilizando a técnica de microdiálise cerebral Freddo e colaboradores (2009) investigaram a farmacocinética cerebral do ácido valpróico incorporado em nanocápsulas revestidas com quitosana e obtiveram um aumento de 5 vezes no fator de penetração cerebral em relação ao fármaco livre. Lindqvist e colaboradores (2013) demonstraram aumento e prolongamento do efeito antinociceptivo do peptídeo DAMGO presente em lipossomas peguizados e conjugados com glutatona, além de um incremento significativo na penetração cerebral desse composto determinado através de microdiálise cerebral.

Bommana e colaboradores (2012) investigaram a captação cerebral de FITC- dextran (FD4) encapsulado em nanopartículas poliméricas recobertas com anticorpos (CD-71 /OX-26) methoxy-poly(etilenoglicol)-poli(ácido láctico) (Met-PEG-

PLA) e maleimina-poli(etilenoglicol)-poli(acido láctico) (Mal-PEG-PLA) através de microdiálise cerebral em ratos da linhagem Sprague Dawle. Os resultados demonstraram que a utilização das nanopartículas imunopeguiladas foi capaz de aumentar e manter a captação do composto FD4, por pelo menos 3 dias, em relação aos animais que receberam FD4 não encapsulado.

A microdiálise cerebral também pode ser utilizada também para investigar o efeito da modulação de proteínas transportadoras (influxo e efluxo) expressas na BHE. Objetivando avaliar o papel da glicoproteína-P no efluxo de fármacos anticonvulsivantes, Postchka e colaboradores (2002) utilizaram MD cerebral em camundongos e avaliaram os níveis cerebrais de fenobarbital, lamotrigina e felbamato, administrados em um regime de monoterapia, na ausência e na presença do verapamil, um inibidor não seletivo da P-gp. Os resultados obtidos evidenciaram que houve um aumento da concentração livre dos três fármacos no SNC quando associados com verapamil indicando o papel de efluxo da P-gp para os três compostos investigados.

3.7. Quetiapina

A quetiapina (QTP) é um fármaco antipsicótico atípico de segunda geração, pertencente à classe dos derivados da dibenzotiazepina (ANDERSON; SANSFIELD; HADDAD, 2009; BELAL et al., 2008), utilizado para o tratamento da esquizofrenia (sintomas positivos e negativos), episódios agudos de mania e também episódios depressivos associados com o transtorno bipolar (BAKKEN et al., 2009). Além disso, a QTP tem sido indicada, ainda que *off-label*, para o tratamento de transtorno obsessivo-compulsivo, autismo, síndrome das pernas inquietas, stress pós traumático e alguns transtornos do sono (CHA et al., 2013).

A QTP é um composto antagonista de receptores de serotonina, dopamina, histamina e receptores adrenérgicos e, apesar de seu exato mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que a ocupação e rápida dissociação desse fármaco nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos é

suficiente para exercer o efeito antipsicótico, sem causar efeitos extrapiramidais ou hiperprolactinemia (VAN OS; KAPUR, 2009).

A investigação da farmacocinética clínica da quetiapina foi realizada por DeVane e Nemeroff (DEVANE; NEMEROFF, 2001) em indivíduos saudáveis e em pacientes esquizofrênicos. Após administração oral o fármaco é rapidamente absorvido alcançando um pico de concentração plasmática ($C_{m\acute{a}x}$) entre 1 e 2 h. Apresenta ligação a proteínas plasmáticas de aproximadamente 83% e estudos realizados em doses únicas e múltiplas evidenciaram que a QTP apresenta farmacocinética linear na faixa terapêutica de 25 a 375 mg duas vezes ao dia, apresentando meia-vida de eliminação variando entre 5 e 7 h. O principal mecanismo de eliminação da QTP é via metabolismo hepático, principalmente através da ação enzimática do CYP3A4, sendo que menos de 1% do fármaco é excretado de forma inalterada na urina.

Existe na literatura uma série de estudos de investigação farmacodinâmica da QTP em modelos animais (CHA et al., 2013; GUAN; DAI; ZHU, 2000; XU et al., 2006) utilizando diferentes doses ($2.5 - 100 \text{ mg.kg}^{-1}$) e vias de administração (intravenosa, oral e intraperitoneal). Entretanto, durante o desenvolvimento e escrita dessa dissertação, não foram encontrados trabalhos que avaliaram a farmacocinética da quetiapina em roedores.

Para a escolha do fármaco modelo para o presente trabalho foi realizado um levantamento das principais propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de uma série de compostos de ação no SNC.

A partir de um trabalho publicado por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2012), que descreveu o mecanismo de distribuição de fármacos na pseudo-fases das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) através de um algoritmo, era desejável que o fármaco modelo apresenta-se um coeficiente de partição ($\log D_{7,4}$) superior a 1.5, o que possibilitaria a obtenção de uma formulação de LNC com o fármaco disperso principalmente no núcleo oleoso do carreador polimérico.

Segundo o algoritmo proposto nesse trabalho, quanto mais lipofílico fosse o fármaco maior seria sua eficiência de encapsulação e distribuição no núcleo da

partícula. Entretanto, a utilização da técnica de microdiálise para compostos altamente lipofílicos apresenta problemas de baixa recuperação relativa ou ligação inespecífica do fármaco à tubulação da sonda (ARAUJO et al., 2008; WHITAKER; LUNTE, 2010). Além disso, existe uma capacidade máxima de encapsulação do fármaco na nanopartícula, não sendo possível obter formulações com alta concentração do fármaco. Dessa maneira, era necessário que o composto modelo desse estudo fosse passível de ser administrado através da via endovenosa em uma dose relativamente baixa, respeitando dessa forma o volume máximo permitido para administração através da veia caudal em ratos. Outro ponto importante era o de que o fármaco deveria ser passível de ser quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência na região do ultravioleta ou através da utilização de um detector de fluorescência. Assim, o fármaco que melhor atendeu a todos os critérios estabelecidos foi a QTP, sendo então selecionada como fármaco modelo para essa investigação.

Nesse contexto, a proposta geral dessa dissertação foi investigar de que maneira a nanoencapsulação modula a farmacocinética plasmática e a distribuição cerebral do fármaco modelo QTP na ausência e na presença de um inibidor de transportador através da BHE, ampliando assim, o entendimento do papel das nanopartículas no *delivery* cerebral de fármacos.

CAPÍTULO 1

**ASSESSING THE MECHANISM OF QUETIAPINE DISTRIBUTION IN
LIPID-CORE NANOCAPSULES PSEUDO-PHASES USING A
VALIDATED LC/UV METHOD**

**ACCESSING THE MECHANISM OF QUETIAPINE DISTRIBUTION IN
LIPID-CORE NANOCAPSULES PSEUDO-PHASES USING A
VALIDATED LC/UV METHOD**

Fernando Carreño, Karina Paese, Sílvia S. Guterres, Teresa Dalla Costa

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga 2752. CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

CAPÍTULO 2

PRE-CLINICAL INVESTIGATION OF THE MODULATION OF QUETIAPINE PLASMA PHARMACOKINETICS AND TISSUES BIODISTRIBUTION BY LIPID-CORE NANOCAPSULES

**PRE-CLINICAL INVESTIGATION OF THE MODULATION OF QUETIAPINE
PLASMA PHARMACOKINETICS AND TISSUES BIODISTRIBUTION BY LIPID-
CORE NANOCAPSULES**

Fernando Carreño, Karina Paese, Carolina Miranda Silva, Sílvia S. Guterres,
Teresa Dalla Costa.

Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal
University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2759, 90610-000 – Porto Alegre, Rio
Grande do Sul.

CAPÍTULO 3

QUANTITATIVE ANALYSIS OF HIPPOCAMPAL DISTRIBUTION OF UNBOUND QUETIAPINE BY MICRODIALYSIS

QUANTITATIVE ANALYSIS OF HIPPOCAMPAL DISTRIBUTION OF UNBOUND QUETIAPINE BY MICRODIALYSIS

Fernando Carreño^a, Carolina de Miranda Silva^a, Stela M. K. Rates^a, Sílvia S.
Guterres^a, Teresa Dalla Costa^a

^aFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Avenida Ipiranga 2752. CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

CAPÍTULO 4

**PHARMACOKINETIC INVESTIGATION OF QUETIAPINE
TRANSPORT ACROSS BLOOD-BRAIN BARRIER MEDIATED BY
LIPID CORE NANOCAPSULES USING BRAIN MICRODIALYSIS IN
RATS**

**PHARMACOKINETIC INVESTIGATION OF QUETIAPINE TRANSPORT
ACROSS BLOOD-BRAIN BARRIER MEDIATED BY LIPID CORE
NANOCAPSULES USING BRAIN MICRODIALYSIS IN RATS**

Fernando Carreño, Karina Paese, Carolina Miranda Silva, Sílvia S. Guterres,
Teresa Dalla Costa.

College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2759,
90610-000 – Porto Alegre, Brazil.

4. DISCUSSÃO GERAL

O tratamento sistêmico de doenças que acometem o sistema nervoso central tais como o Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, tumores cerebrais e epilepsia, entre outras, ainda hoje é um desafio para a indústria farmacêutica, mesmo com o avanço da neurociência na atualidade.

A BHE e a BHL restringem a passagem de fármacos administrados sistemicamente principalmente devido à presença de zônulas de oclusão e a alta condutividade elétrica do endotélio, que restringem o transporte paracelular e a expressão de mecanismos de transporte de influxo e de efluxo que regulam o transporte transcellular de substâncias endógenas e exógenas.

A utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos para o SNC vem sendo intensamente investigada nas últimas décadas e têm se demonstrado efetivas no direcionamento de fármacos para o cérebro. Além disso, esse tipo de partícula apresenta como vantagens a utilização de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis que contribuem ainda mais para uma aplicação clínica desses nanocarreadores.

Apesar de promissores, as alterações farmacocinéticas relacionadas à nanoencapsulação e as interações desses nanocarreadores com as barreiras fisiológicas do SNC ainda são pouco conhecidas. Nesse contexto, este trabalho pretendeu investigar, através da utilização de um nanocarreador polimérico de núcleo lipídico (LNC), as alterações da farmacocinética plasmática e da distribuição cerebral de um fármaco modelo com ação no sistema nervoso central, a QTP, permitindo assim um maior entendimento do papel desses transportadores no *delivery* cerebral de fármacos.

A escolha da QTP como fármaco modelo para esse trabalho levou em consideração características físico-químicas da molécula, como o LogD, buscando aumentar a eficiência de encapsulação e a distribuição do composto no núcleo da partícula. Outra característica importante para a escolha do fármaco foi a possibilidade de ser quantificado através de cromatografia líquida na região do UV/Vis. Além disso, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da molécula foram considerados como moderada ligação as proteínas plasmáticas, eficácia em animais em baixas doses e tempo de meia-vida curto, permitindo assim a utilização da técnica de microdiálise cerebral nos experimentos.

Escolhe-se a utilização da microdiálise cerebral como ferramenta para este trabalho, pois essa técnica permite a determinação de concentrações livres de compostos em diferentes regiões do organismo, possibilitando um melhor entendimento das diferenças de permeação tecidual do fármaco administrado em solução quando comparado com o fármaco administrado nanoencapsulado.

Buscando atingir o objetivo geral deste trabalho, inicialmente foram preparadas nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com um núcleo lipídico composto por triglicerídeos de cadeia média (cáprico e caprílico) e monoestearato de sorbitano contendo QTP na concentração de 1 mg/mL (QLNC), através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado (Capítulos 1 e 4).

A caracterização físico-química das nanocápsulas foi realizada através da determinação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão utilizando as técnicas de difração de laser, espalhamento dinâmico de luz e da análise do monitoramento das nanopartículas (NTA). Em todas as técnicas utilizadas a

formulação de nanocápsulas apresentou tamanho nanométrico médio de 190 nm. O baixo índice de polidispersão obtido ($PI < 0.2$) indica que a distribuição do tamanho das partículas foi homogênea, com ausência de partículas de tamanho microscópico (Capítulo 1).

O potencial zeta da formulação, medido através da mobilidade eletroforética das partículas, apresentou valores negativos em torno de -8 mV, principalmente devido a presença do polímero poli(ϵ -caprolactona) que compõe a parede da nanocápsula. Esse valor é considerado adequado e contribui, através do fenômeno de repulsão eletrostática, com a manutenção da estabilidade do sistema coloidal evitando fenômenos de coalescência ou cremagem das nanoestruturas. O valor de pH das formulações situou-se em torno de 6,8 avaliado logo após o preparo e era esperado considerando as matérias primas utilizadas e o método de preparação empregado. Não houve mudanças consideráveis no pH da formulação medido 10 dias depois do preparo. A análise morfológica através de microscopia eletrônica de transmissão evidenciou a presença de nanocápsulas esféricas e homogêneas e a ausência de aglomerados nas formulações em todos os aumentos investigados (Capítulo4).

Para quantificação da QTP nas LNC foi desenvolvido um método por LC/UV, que foi validado de acordo com as normas da ANVISA e do ICH e demonstrou-se específico, linear, preciso e exato, permitindo a sua aplicação na quantificação da QTP associada às nanocápsulas (Capítulo 1).

A aplicação de um algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2012) demonstrou que a distribuição da QTP na LNC é do tipo III, sendo que uma

grande parte do fármaco encontra-se disperso no núcleo e na parede polimérica da partícula e o restante (cerca de 2% no caso da QTP) encontra-se em solução (Capítulo 1).

O teor da formulação QLNC foi de aproximadamente 98%, sendo muito próximo das concentrações teóricas. Além disso, a alta eficiência de encapsulação encontrada (~95%) indica elevada capacidade de encapsulação da QTP e corroboram os dados obtidos na aplicação do algoritmo (Capítulo 1).

Diante dos resultados da caracterização da formulação de QLNC a mesma foi considerada adequada para os estudos em animais.

Um método bioanalítico foi desenvolvido em LC/UV e validado, de acordo com as normas do FDA, para quantificação da QTP em amostras de plasma e tecido hepático e cerebral de ratos. A QTP foi extraída das amostras biológicas utilizando-se acetato de etila e o padrão interno utilizado foi a clozapina devido à similaridade físico-química e estrutural com a QTP. Os resultados da validação indicaram que o método foi linear, preciso, exato, com boa taxa de recuperação do fármaco e sensibilidade adequada para os estudos proposto (Capítulo 2).

Também foi desenvolvido e validado por LC/UV um método bioanalítico para a quantificação da QTP em amostras de microdialisado cerebral e plasmático que apresentou desempenho de acordo com o preconizado pelo guia do FDA. (Capítulo 3).

Após validação o método foi utilizado para a calibração *in vitro* (através das técnicas de diálise e retrodiálise) e *in vivo* (através da técnica de retrodiálise) das sondas de microdiálise cerebral (CMA-12) e microdiálise plasmática (CMA-20) utilizadas nesse trabalho. Apesar de a QTP apresentar um grau de lipofilia

moderado, o que muitas vezes pode ser um fator limitante para estudos de microdiálise devido à ligação do fármaco à tubulação do sistema, esse problema não ocorreu para QTP. Os dois métodos de recuperação utilizados na calibração das sondas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todas as condições investigadas. Além disso, não houve dependência da concentração de QTP na recuperação relativa tanto para a sonda cerebral (CMA-12) quanto para a sonda plasmática (CMA-20). O fluxo de trabalho escolhido foi de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ para a microdiálise cerebral e 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ para a microdiálise plasmática, por apresentarem uma boa taxa de recuperação e permitirem coletas de amostras em intervalos de 30 min com volumes suficientes para a quantificação por LC/UV.

A calibração das sondas foi realizada também *in vivo* pela técnica de retrodiálise e o valor obtido foi utilizado para calcular o valor real das concentrações livres atingidas no tecido cerebral e no plasma, multiplicando-se os valores de concentração tecidual pela taxa de recuperação média *in vivo*, após administração do fármaco em solução ou suspensão de nanocápsulas. A recuperação relativa para a sonda cerebral foi de $22.9 \pm 4.9 \%$ e para a sonda utilizada para amostragem de concentração livre plasmática foi de $37.5 \pm 4.3\%$ (Capítulos 3 e 4, respectivamente).

Também foi determinado *in vitro* o coeficiente de partição da QTP nos eritrócitos para o fármaco em solução (FQ) e para o fármaco nanoencapsulado (QLNC). Os valores obtidos foram semelhantes (FQ: 1.29 ± 0.19 e QLNC: 1.43 ± 0.39) e maiores do que 1 indicando que a QTP possui boa capacidade de penetração nos eritrócitos e que a encapsulação em LNC não altera essa penetração (Capítulo 4).

A ligação às proteínas plasmáticas também foi investigada *in vitro* e foi concentração-independente com valor médio de 72% (Capítulo 3).

De posse dos métodos analíticos e após calibração das sondas de microdiálise foi possível avaliar e comparar a farmacocinética plasmática, a fração livre no plasma e a distribuição cerebral da QTP em roedores após administração intravenosa (i.v. *bolus*) do fármaco livre (FQ) ou nanoencapsulado (QLNC) na presença e na ausência de probenecida, um conhecido inibidor de transportadores na BHE (Capítulo 4).

A avaliação da farmacocinética plasmática e da distribuição cerebral da QTP foram realizadas no mesmo animal 48 h após procedimento cirúrgico para implantação de um cateter na veia jugular direita e de uma guia de sonda no hipocampo. O período de 48 horas após a implantação da sonda tem sido descrito na literatura como um período adequado para recuperação da integridade do tecido cerebral e restabelecimento da BHE, que pode ter sido danificada durante a implantação da sonda (BOSTRÖM et al., 2006; LANGE, 2013). Os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e teciduais foram calculados através de análise não-compartimental dos dados.

QTP em solução foi administrada i.v. *bolus* na dose de 5 mg/kg para o grupo FQ-5 e na dose de 10 mg/kg para os grupos FQ-10, PBFQ-10 e FFQ-10 através da veia caudal lateral. Enquanto que o fármaco nanoencapsulado foi administrado na dose de 5 mg/kg para os grupos QLNC-5; PBQLNC-5 e FQLNC-5 utilizando o mesmo sítio de administração. Os grupos de animais PBFQ-10 e PBQLNC-5 receberam, 30 min antes da administração da respectiva formulação

de QTP, uma dose de 30 mg/kg de probenecida administrada pela veia lateral caudal distinta da que seria utilizada para a administração da QTP.

Não foram encontradas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos: tempo de meia-vida, razão $AUC_{0-\infty}/Dose$ e *clearance* para os grupos de animais que receberam QTP em solução nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg indicando que o fármaco apresenta farmacocinética linear na faixa de dose investigada nesse trabalho.

Análise não-compartimental dos dados de plasma mostrou que houve diminuição significativa do *clearance* total após a administração de QLNC-5 e essa diminuição se refletiu em um significativo aumento da exposição do organismo ao fármaco, evidenciado pelo aumento da área sob a curva (ASC) no grupo QLNC-5 comparado com o grupo FQ-5. Alterações significativas no volume de distribuição ($V_{d_{ss}}$) não foram evidenciadas. Quando a QTP em solução foi co-administrada com a probenecida (Grupo PBFQ-10) houve uma significativa redução do *clearance* total do fármaco, aumentando a exposição plasmática em comparação com o grupo FQ-5. Entretanto, no grupo de animais que recebeu QLNC a probenecida não foi capaz de promover nenhuma alteração significativa nos parâmetros farmacocinéticos plasmáticos analisadas.

Um aumento da exposição hepática à QTP foi observado, em homogeneizado de tecido após a administração da QLNC-5 (Capítulo 2), provavelmente devido a uma redução no metabolismo do fármaco que encontra-se impedido de interagir com enzimas do complexo citocromo P-450, principal via de eliminação da QTP, devido à nanoencapsulação.

Maior penetração cerebral de QTP quando encapsulada na LNC também foi observada quando homogeneizados de cérebro foram analisados. Houve um aumento da exposição cerebral à QTP, provavelmente devido ao aumento na área sob a curva plasmática no grupo de animais que receberam QLNC, indicando a capacidade de vetorização do fármaco nanoencapsulado para o cérebro.

A análise não-compartimental dos perfis livres cerebrais de QTP obtidos por microdiálise não mostrou diferenças significativas na meia-vida e na área sob a curva de concentração-tempo cerebral quando FQ-5 e QLNC-5 foram comparados.

O fator de penetração tecidual, calculado através da razão de $ASC_{\text{livre,cérebro}}/ASC_{\text{livre,plasma}}$, obtido para QTP administrada em solução (FQ-5) foi de aproximadamente 1.6 indicando que existem transportadores de influxo envolvidos na penetração cerebral da QTP através da BHE. Porém, quando o fármaco foi administrado nas LNC ele não estava disponível para interagir com esses transportadores, determinando-se um fator de penetração cerebral de 0.88 ± 0.21 .

A administração concomitante de probenecida reduziu a exposição do cérebro à QTP livre, levando a redução do fator de penetração cerebral para valor próximo a 1 (0.94 ± 0.15), comprovando que quando os transportadores de influxo, sensíveis a probenecida, na BHE estão inibidos o principal mecanismo de penetração cerebral do fármaco é a difusão.

Novamente a administração de probenecida concomitante com fármaco nanoencapsulado (QLNC-5) não evidenciou alterações significativas nos parâmetros farmacocinéticos cerebrais, nem no fator de penetração, reforçando a

hipótese de que a nanoencapsulação em LNC tipo III protege o fármaco no plasma e transporta o mesmo para o parênquima cerebral.

Além disso, a avaliação da fração livre plasmática *in vivo* após administração das LNCs (grupo FQLNC) foi menor, logo após a administração das nanocápsulas, quando comparado com o fármaco em solução (grupo FFQ) e aumentou gradativamente com o passar do tempo até 3 h, quando atingiu valor semelhante do grupo FFQ. Esse resultado evidencia que as LNCs tipo III circular na corrente sanguínea carregando a QTP nanoencapsulada, que fica indisponível para interagir com as proteínas plasmáticas, liberando o fármaco de modo sustentando por até 3 h após administração intravenosa.

Assim, o conjunto de resultados aqui apresentados evidencia que as LNC tipo III são promissoras para o *delivery* de fármacos para o cérebro uma vez que tem a capacidade de modular a farmacocinética plasmática e carrear o fármaco através da BHE, além de proteger o fármaco do metabolismo e da ação de transportadores, o que pode ser de grande valia para fármacos que possuem elevado efeito de efluxo mediado, por exemplo, pela P-gp.

5. CONCLUSÕES

- Os métodos bioanalíticos desenvolvidos em LC/UV e validados para determinação da QTP em amostras biológicas de plasma, tecido cerebral e hepático, microdialisado cerebral, microdialisado plasmático e também o método analítico desenvolvido para quantificação do fármaco na formulação de nanocápsulas demonstraram performance de acordo com o preconizado pelos guias de validação nacional e internacionais e foram adequados para as investigações propostas nesse trabalho;
- A formulação QLNC apresentou tamanho de partícula reduzido, distribuição homogênea, baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo e pH levemente ácido. A análise morfológica através de MET evidenciou partículas esféricas e ausência de agregados. O teor da formulação foi muito próximo do valor nominal com elevada eficiência de encapsulação e distribuição principalmente no núcleo e paredes da nanocápsulas (LNC tipo III) indicando serem adequadas para os objetivos do trabalho;
- Os perfis de concentração plasmática *versus* tempo obtidos após administração intravenosa de QTP em solução (dose 5 mg/kg ou 10 mg/kg) ou nanoencapsulada (QLNC - 5 mg/kg) demonstraram que o carreador utilizado foi capaz de proteger o fármaco na circulação sistêmica, com redução do *clearance* plasmático total;

- A utilização da probenecida como inibidor de transportadores de membrana na dose de 30 mg/kg i.v. *bolus* foi capaz de alterar a farmacocinética plasmática da QTP levando a redução do *clearance* e aumento da exposição sistêmica. Entretanto, não foram evidenciadas diferenças significativas quando a probenecida foi administrada concomitantemente com o fármaco nanoencapsulado;
- A fração de QTP ligada às proteínas plasmáticas é de $72 \pm 2\%$ sendo a ligação concentração independente na faixa investigada (0.025 – 3.0 ug/mL);
- O coeficiente de partição nos eritrócitos avaliado *in vitro* foi similar e maior que 1 para ambas as formulações investigadas (QLNC e FQ), indicando que a QTP possui boa penetração nos eritrócitos e que a nanoencapsulação não foi capaz de alterar esse coeficiente;
- A distribuição hepática e cerebral da QTP, investigada através da técnica de homogeneizado de tecido, aumentou significativamente quando o fármaco foi administrado nanoencapsulado (QLNC) em comparação com a administração do fármaco livre;

- A penetração da QTP através da BHE envolve transportadores de influxo além do processo de difusão passiva. Não foi possível observar o envolvimento de transportadores de efluxo nos estudos realizados;
- As LNC tipo III (QLNC) carrearam a QTP no plasma, promovendo uma liberação do fármaco por até 2 horas após a administração intravenosa da formulação;
- As LNC tipo III (QLNC) carrearam a QTP através da BHE, protegendo o fármaco da ação dos transportadores de influxo.
- As LCN tipo III (QLNC) possuem a capacidade de vetorização do fármaco para o cérebro e de carregá-lo através da BHE para o parênquima cerebral

6. REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 1, p. 5–23, 2005.

ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.

ABBRUSCATO, T. J. et al. Regulation of Blood-Brain Barrier Na,K,2Cl-Cotransporter through Phosphorylation during in Vitro Stroke Conditions and Nicotine Exposure. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 459–468, 2004.

ANDERSON, I. M.; SARFIELD, A.; HADDAD, P. M. Efficacy, safety and tolerability of quetiapine augmentation in treatment resistant depression: An open-label, pilot study. **Journal of Affective Disorders**, v. 117, n. 1–2, p. 116–119, 2009.

ARAÚJO, B. V. et al. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 4–5, p. 876–881, 2008.

BAKKEN, G. V. et al. Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B5. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 37, n. 2, p. 254–258, 2009.

BARCIA, J. A.; GALLEGO, J. M. Intraventricular and intracerebral delivery of anti-epileptic drugs in the kindling model. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 6, n. 2, p. 337–343, 2009.

BELAL, F. et al. Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Quetiapine: Application to Tablets and Human Plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 9, p. 1283–1298, 2008.

BHASKAR, S. et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, p. 3, 2010.

BOMMANA, M. M.; KIRTHIVASAN, B.; SQUILLANTE, E. In vivo brain microdialysis to evaluate FITC-dextran encapsulated immunopegylated nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 19, n. 6, p. 298–306, 2012.

BONKOWSKI, D. et al. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 8, p. 8, 2011.

BOSTRÖM, E.; SIMONSSON, U. S. H.; HAMMARLUND-UDENAES, M. In Vivo Blood-Brain Barrier Transport of Oxycodone in the Rat: Indications for Active Influx and Implications for Pharmacokinetics/Pharmacodynamics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 9, p. 1624–1631, 2006.

BOULTON, D. W. et al. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. **Life Sciences**, v. 71, n. 2, p. 163–169, 2002.

BREEDVELD, P. et al. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. **Cancer Research**, v. 65, n. 7, p. 2577–2582, 2005.

CHA, H. J. et al. Dependence Potential of Quetiapine: Behavioral Pharmacology in Rodents. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 307–312, 2013.

CHATTOPADHYAY, N. et al. Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2262–2271, 2008.

CHEN, X. et al. Effect of transporter inhibition on the distribution of cefadroxil in rat brain. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 11, n. 1, p. 25, 2014.

COLEY, H. M. et al. Incidence of P-glycoprotein overexpression and multidrug resistance (MDR) reversal in adult soft tissue sarcoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 36, n. 7, p. 881–888, 2000.

COLEY, H. M. et al. Assessment of the classical MDR phenotype in epithelial ovarian carcinoma using primary cultures: a feasibility study. **Anticancer Research**, v. 22, n. 1A, p. 69–74, 2002.

CORNFORD, E. M. Epilepsy and the blood brain barrier: endothelial cell responses to seizures. **Advances in neurology**, v. 79, p. 845–862, 1999.

DAMKIER, H. H.; BROWN, P. D.; PRAETORIUS, J. Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2010.

DEGUCHI, Y.; MORIMOTO, K. Application of an in vivo brain microdialysis technique to studies of drug transport across the blood-brain barrier. **Current drug metabolism**, v. 2, n. 4, p. 411–423, 2001.

DEL AMO, E. M.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 161–174, 2008.

DEVANE, C. L.; NEMEROFF, C. B. Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 7, p. 509–522, 2001.

DEVRAJ, K. et al. GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 12, p. 1913–1925, 2011.

DHAWAN, S.; KAPIL, R.; SINGH, B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 342–351, 2011.

DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15665–15670, 1998.

ELMSHÄUSER, S. et al. Brain penetration of emodepside is increased in P-glycoprotein-deficient mice and leads to neurotoxicosis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 1, p. 74–79, 2015.

ENDRES, C. J. et al. The role of transporters in drug interactions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 501–517, 2006.

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 4, p. 497–511, 2009.

ENGIDAWORK, E. et al. Expression of the multidrug resistance P glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance associated protein (MRP1) in Down syndrome brains. **Journal of Neural Transmission. Supplementum**, n. 61, p. 35–45, 2001.

ERDMAN, A. R. et al. The human organic anion transporter 3 (OAT3; SLC22A8): genetic variation and functional genomics. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 290, n. 4, p. F905–912, 2006.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FISHMAN, J. B. et al. Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, n. 2, p. 299–304, 1987.

FRANCESCA, B.; REZZANI, R. Aquaporin and Blood Brain Barrier. **Current Neuropharmacology**, v. 8, n. 2, p. 92–96, 2010.

FREDDO, R.J. **Estudos para Obtenção e Caracterização de Sistemas Nanoparticulados Contendo Ácido Valpróico e Avaliação da Penetração Deste Através da Barreira Hematoencefálica**. 2009. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/60656>>. Acesso em dezembro 2014.

FRICKER, G.; MILLER, D. S. Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. **Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 169–176, 2004.

FUJIYOSHI, M. et al. 24S-hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 4, p. 968–978, 2007.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of Disease**, Special Issue: Blood Brain Barrier. v. 37, n. 1, p. 48–57, 2010.

GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 10, p. 2485–2498, 2013.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1–2, p. 213–219, 2006.

GARCION, E. et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 7, p. 1710–1722, 2006.

GARLAND, M. et al. Placental transfer and fetal elimination of morphine-3- β -glucuronide in the pregnant baboon. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 36, n. 9, p. 1859–1868, 2008.

GEYER, J.; JANKO, C. Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macrocyclic Lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 969–986, 2012.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L. et al. Tight junction proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–44, 2003.

GUAN, H. J.; DAI, J.; ZHU, X. Z. Atypical antipsychotic effects of quetiapine fumarate in animal models. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 21, n. 3, p. 205–210, 2000.

GUPTA, Y.; JAIN, A.; JAIN, S. K. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 7, p. 935–940, 2007.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new

nomenclature and molecular/functional properties. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 653–665, 2004.

HAMMARLUND-UDENAES, M. The use of microdialysis in CNS drug delivery studies. Pharmacokinetic perspectives and results with analgesics and antiepileptics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 45, n. 2-3, p. 283–294, 2000.

HAMMARLUND-UDENAES, M. et al. On The Rate and Extent of Drug Delivery to the Brain. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1737–1750, 2008.

HATAKEYAMA, H. et al. Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1-2, p. 25–33, 2004.

HAWKINS, R. A. et al. Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 218S–226S, 2006.

HEDIGER, M. A. et al. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 465–468, 2004.

HENTHORN, T. K. et al. Active transport of fentanyl by the blood-brain barrier. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 2, p. 1084–1089, 1999.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 66, n. 17, p. 2873–2896, 2009.

HUANG, G. et al. Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardiac and nephric toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 314–320, 2008.

JÄGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 297–305, 2007.

JAIN, A. et al. Mannosylated solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of an anti-cancer drug. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 148, n. 3, p. 359–367, 2010.

JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S. Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 33–37, 2010.

JONG, N. N. et al. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 2, p. 537–547, 2011.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 693–705, 2009.

KELLER, A. Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 143, p. w13892, 2013.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 65–81, 2001.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LANGE, E. C. DE. The mastermind approach to CNS drug therapy: translational prediction of human brain distribution, target site kinetics, and therapeutic effects. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 10, n. 1, p. 12, 2013.

LEMAIRE, M.; DESRAYAUD, S. The priorities/needs of the pharmaceutical industry in drug delivery to the brain. **International Congress Series**, v. 1277, p. 32–46, 2005.

LINDQVIST, A. et al. Enhanced brain delivery of the opioid peptide DAMGO in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1533–1541, 2013.

LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 962–977, 2011.

LI, W. et al. Glutathione in Cerebral Microvascular Endothelial Biology and Pathobiology: Implications for Brain Homeostasis. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. e434971, 2012.

LOHMANN, C.; HÜWEL, S.; GALLA, H. J. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 4, p. 263–276, 2002.

LU, C.-T. et al. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2241–2257, 2014.

MARCHAND, S. et al. Norfloxacin Blood-Brain Barrier Transport in Rats Is Not Affected by Probenecid Coadministration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 371–373, 2006.

MARK, K. S.; DAVIS, T. P. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 4, p. H1485–1494, 2002.

MIKKAICHI, T. et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3569–3574, 2004.

MUEHLBACHER, M. et al. Qualitative prediction of blood–brain barrier permeability on a large and refined dataset. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 12, p. 1095–1106, 2011.

MULDOON, L. L. et al. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 13–21, 2013.

NAU, R.; SÖRGEL, F.; EIFFERT, H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 858–883, 2010.

NGWULUKA, N. et al. Levodopa delivery systems: advancements in delivery of the gold standard. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 2, p. 203–224, 2010.

OHTSUKI, S.; TERASAKI, T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 9, p. 1745–1758, 2007.

OKURA, T. et al. Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 36, n. 10, p. 2005–2013, 2008.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 2012.

PALMEIRA, A. et al. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1946–2025, 2012.

PALMER, A. M. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 3–12, 2010.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 11, p. 1959–1972, 2012.

PATEL, T. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 701–705, 2012.

PATHAN, S. A. et al. CNS drug delivery systems: novel approaches. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 1, p. 71–89, 2009.

POTSCHKA, H.; FEDROWITZ, M.; LÖSCHER, W. P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. **Neuroscience letters**, v. 327, n. 3, p. 173–176, 2002.

PRIANO, L. et al. Baclofen-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, electrophysiological assessment of efficacy, pharmacokinetic and tissue distribution in rats after intraperitoneal administration. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 79, n. 1, p. 135–141, 2011.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 2013.

RE, F.; GREGORI, M.; MASSERINI, M. Nanotechnology for neurodegenerative disorders. **Maturitas**, v. 73, n. 1, p. 45–51, 2012.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222–227, 2011.

RONALDSON, P. T. et al. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 3, p. 788–800, 2004.

RONALDSON, P. T.; DAVIS, T. P. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3624–3644, 2012.

RONALDSON, P. T.; DAVIS, T. P. Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 291–314, 2013.

ROTH, M.; OBADAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1260–1287, 2012.

RUNKLE, E. A.; MU, D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 337, n. 1, p. 41–48, 2013.

SAI, Y. et al. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 34, n. 8, p. 1423–1431, 2006.

SANCHEZ-COVARRUBIAS, L. et al. Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 10, p. 1422–1449, 2014.

SÁ-PEREIRA, I.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Neurovascular unit: a focus on pericytes. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 327–347, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHERRMANN, J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 6, p. 349–354, 2002.

SCHUURHUIS, G. J. et al. Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 81–93, 1995.

SIMIONESCU, M.; GAFENCU, A.; ANTOHE, F. Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 5, p. 269–288, 2002.

SPEAKE, T. et al. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. **Microscopy Research and Technique**, v. 52, n. 1, p. 49–59, 2001.

STAMATOVIC, S. M.; KEEP, R. F.; ANDJELKOVIC, A. V. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 179–192, 2008.

STAUD, F.; PAVEK, P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 4, p. 720–725, 2005.

STENEHJEM, D. D. et al. Novel and emerging strategies in drug delivery for overcoming the blood–brain barrier. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 9, p. 1623–1641, 2009.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.-F. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. **Neurogenomics**, v. 9, p. 21, 2015.

SUN, D.; LYTLE, C.; O'DONNELL, M. E. IL-6 secreted by astroglial cells regulates Na-K-Cl cotransport in brain microvessel endothelial cells. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 6 Pt 1, p. C1829–1835, 1997.

TAMAI, I. et al. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. **FEBS Letters**, v. 419, n. 1, p. 107–111, 1997.

TAMAI, I. et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 32, p. 20378–20382, 1998.

TAMAI, I.; TSUJI, A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 11, p. 1371–1388, 2000.

TAMARGO, R. J. et al. The intracerebral administration of phenytoin using controlled-release polymers reduces experimental seizures in rats. **Epilepsy Research**, v. 48, n. 3, p. 145–155, 2002.

THOMAS, H.; COLEY, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 10, n. 2, p. 159–165, 2003.

TSUJI, A. Small Molecular Drug Transfer across the Blood-Brain Barrier via Carrier-Mediated Transport Systems. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 54–62, 2005.

TUNBLAD, K.; JONSSON, E. N.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Morphine blood-brain barrier transport is influenced by probenecid co-administration. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 618–623, 2003.

UCHIDA, Y. et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 2, p. 333–345, 2011.

VAN OS, J.; KAPUR, S. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 374, n. 9690, p. 635–645, 2009.

VARMA, M. V. et al. pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1303–1313, 2011.

VENISHETTY, V. K. et al. Increased brain uptake of docetaxel and ketoconazole loaded folate-grafted solid lipid nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 111–121, 2013.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 200–208, 2011.

VORBRODT, A. W.; DOBROGOWSKA, D. H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 42, n. 3, p. 221–242, 2003.

WHITAKER, G.; LUNTE, C. E. Investigation of Microdialysis Sampling Calibration Approaches for Lipophilic Analytes: Doxorubicin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n. 3, p. 490–496, 2010.

WHO, World Health Organization, 2009. Neurology and Public Health. Disponível em <http://www.who.int/mental_health/neurology/en/>. Acesso em dezembro de 2014. [s.d.].

WINKLER, E. A. et al. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 10, p. 1841–1852, 2012.

WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 7, p. 686–700, 2012.

XIE, F. et al. Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 163–175, 2012.

XU, H. et al. Synergetic effects of quetiapine and venlafaxine in preventing the chronic restraint stress-induced decrease in cell proliferation and BDNF expression in rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, n. 6, p. 551–559, 2006.

YARIM, M. et al. Application of QSAR analysis to organic anion transporting polypeptide 1a5 (Oatp1a5) substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 463–471, 2005.

ZHANG, X. et al. Analytical methods for brain targeted delivery system in vivo: perspectives on imaging modalities and microdialysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 59, p. 1–12, 2012.

7. ANEXOS

7.1 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal CEUA-UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 25737

Título: INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE PENETRAÇÃO CEREBRAL DA QUETIAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS SADIOS E COM SUPEREXPRESSION DE GLICOPROTEÍNA-P ATRAVÉS DE MICRODIÁLISE

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/04/2013

SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - pesquisador desde 01/04/2013

Fernando Olinto Carreño - Aluno de Mestrado desde 01/04/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 30/10/2013 - Sala 330 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 86 ratos machos, Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 4 de Novembro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética