

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

Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) da  
Quetiapina Nanoencapsulada em Modelo Animal de Esquizofrenia

FERNANDO OLINTO CARREÑO

Porto Alegre, 2019



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

Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) da  
Quetiapina Nanoencapsulada em Modelo Animal de Esquizofrenia

Tese apresentada por **Fernando Olinto Carreño**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2019

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada com louvor em 16 de agosto de 2019, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andresa Heemann Betti  
Universidade Feevale

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Hartmut Derendorf  
University of Florida

Prof. Dr. Manuel Ibarra Viñales  
Universidad de la República

#### CIP - Catalogação na Publicação

Carreño, Fernando  
Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD)  
da Quetiapina Nanoencapsulada em Modelo Animal de  
Esquizofrenia / Fernando Carreño. -- 2019.  
240 f.  
Orientadora: Teresa Dalla Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico. 2.  
esquizofrenia. 3. poli(i:c). 4. modelo  
neurodesenvolvimental de esquizofrenia. 5. modelagem  
farmacocinética/farmacodinâmica. I. Dalla Costa,  
Teresa, orient. II. 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 Laboratório de Farmacocinética e Modelagem PK/PD, Laboratório de Psicofarmacologia Experimental e Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) em Porto Alegre - RS e no *Pharmacometrics and Systems Pharmacology Group* da Universidade de Navarra em Pamplona – Espanha, com apoio financeiro do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq e bolsa de doutorado sanduíche da Coordenação Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.



## AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Teresa Dalla Costa, por ter contribuído de forma ímpar com meu crescimento profissional, pelo exemplo profissional e comprometimento que tens com uma formação de excelência para teus alunos.

Às professoras Stela Rates, Ana Paula Herrmann, Sílvia Guterres e Karina Paese pelo apoio e orientação durante os experimentos realizados nos Laboratórios de Psicofarmacologia Experimental e Nanotecnologia Farmacêutica da UFRGS e também pelas importantes discussões científicas que fazem parte desta tese, foi um grande prazer trabalhar e aprender com vocês.

Al Prof. Iñaki Trocóniz me gustaría agradecerle el haberme brindado la oportunidad de realizar mi estancia en su grupo de investigación “Pharmacometrics and Systems Pharmacology” (P&SP) de la Universidad de Navarra. Gracias por tu dedicación, tus inestimables consejos y colaboración activa con esta tesis.

À veterinária Fabíola Schons Meyer e aos técnicos do biotério da bioquímica, em especial à Cláudia Kras, Cibele Kelm Marques e Luiza Falcão Funez. Sem o cuidado diário dedicado a cada um dos animais utilizados neste trabalho seria impossível chegar até aqui.

Ao Dr. Fabiano Barreto, pelo comprometimento e disponibilização do LC-MS/MS e do tempo, especialmente durante os finais de semana, para a concretização de experimentos que compõe esta tese.

À Victória Etges Helfer que topou embarcar nessa “aventura esquizofrênica” comigo e trabalhou ativa e incansavelmente ao meu lado em todas as etapas deste trabalho. A ti dedico uma medalha de ouro pela atuação como bolsista de iniciação científica nesta tese.

Às amigas que fiz nesse tempo de FAFAR: Izabel Almeida Alves, Bruna Torres, Graziela Lock, Keli Staudt, Ricardo Lorenzoni, Bruna Dias, Laura Olivo, Ana Lúcia Xavier. Por estarem sempre ao meu lado me dando força e animação para superar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

Aos demais colegas do laboratório de farmacocinética e modelagem PK/PD com quem convivi durante essa trajetória e à professora Bibiana Verlindo de Araújo que além das discussões científicas nos seminários está sempre buscando proporcionar ao grupo diferentes experiências acadêmicas na área de farmacometria.

Me gustaría agradecer también a cada una de las personas que han sido parte del grupo P&SP mientras estuve allí: mi clon Diego, Nico, Vío, Belén, Itziar, Leire, Edu y Zinnia. Gracias por hacer mi estancia en el grupo muy alegre y de mucho aprendizaje (modelización, castellano, cultura y política española) y por brindarme vuestra compañía cuando echaba de menos a mi familia. Sois grandes personas y os deseo siempre lo mejor.

Aos colegas do grupo de Psicofarmacologia Experimental e Nanotecnologia Farmacêutica da UFRGS por sempre me receberem de braços abertos e com uma xícara de café.

Aos meus pais, Felipe e Maura Carreño, por terem inculcido em mim os valores que me tornaram a pessoa que sou hoje. Por sempre permitirem que eu seguisse meu próprio caminho estando ao meu lado nas conquistas e derrotas.

À minha irmã Flávia Carreño, com quem tenho orgulho de compartilhar não apenas o gosto pela ciência mas também meu DNA. E ao Richard, que sempre vibra com as minhas conquistas e a quem eu tenho como um irmão.

E por fim, o agradecimento mais especial e carinhoso à Caroline, minha companheira de vida! O teu amor foi o pilar e a força motriz que me fizeram chegar até aqui. Eu amo você e amo a nossa família!



À minha família,  
Caroline, Nix, Atena, Fly e quem ainda está por vir.



For such a model there is no need to ask the question "Is the model true?". If "truth" is to be the "whole truth" the answer must be "No". The only question of interest is "Is the model illuminating and useful?"

George. E.P. Box



## RESUMO

A esquizofrenia (SCZ) é uma condição psiquiátrica debilitante que afeta aproximadamente 1% da população mundial. A alta variabilidade observada na resposta crônica ao tratamento da SCZ pode estar relacionada a disfunções da barreira hematoencefálica (BHE) que impactam no transporte de fármacos antipsicóticos (APD) para o sistema nervoso central (SNC). Com base na hipótese que a redução na penetração cerebral de fármacos para o SNC em pacientes com SCZ poderia estar associada à resistência à farmacoterapia foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) visando melhorar o *delivery* de APD para o cérebro. Buscando aumentar a compreensão do papel deste tipo de nanocarreador polimérico na disposição de fármacos para o SNC, nesta tese desenvolvemos um modelo farmacocinético/farmacodinâmico populacional (popPK/PD) capaz de descrever as alterações na farmacocinética plasmáticas e na distribuição cerebral da quetiapina (QTP) e nos níveis extracelulares corticais de dopamina após administração do fármaco em solução (FQ) ou nanoencapsulado (QLNC) a ratos machos e fêmeas hígdos e com SCZ experimental (SCZ-like). QLNC (1 mg/mL) foram obtidas por nanoprecipitação e apresentaram tamanho médio de  $166 \pm 39$  nm, baixo índice de polidispersão ( $< 0,15$ ) e alta eficiência de encapsulação ( $93 \pm 1,38\%$ ). O modelo neurodesenvolvimental de SCZ induzido pela administração de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(i:c)] a ratas prenhas foi utilizado para obter os animais com SCZ experimental. Ratas Wistar prenhas (GD15) receberam diferentes doses i.v *bolus* de poli(i:c). Déficits comportamentais na prole adulta (PND75) foram avaliados pelos testes de labirinto em cruz elevado (EPM), inibição de sobressalto por pré-pulso (PPI) e hiperlocomoção induzida pelo MK-801 em comparação à prole de fêmeas prenhas (GD15) que receberam volume equivalente de solução salina estéril (animais hígdos). Ratos SCZ-like foram tratados com FQ e QLNC havendo restauração dos déficits apresentados no PPI apenas quando o fármaco nanoencapsulado foi utilizado. Para a investigação PK amostras de plasma e microdialisado cerebral (hipocampo ventral – HIP e córtex pré-frontal medial - mPFC) foram coletadas de machos e fêmeas hígdos e SCZ-like após administração intravenosa de FQ (5 e 10 mg / kg) ou QLNC (5 mg/kg). Observou-se uma redução significativa da exposição cerebral livre à QTP quando ratos SCZ-like foram administrados com FQ em comparação com animais hígdos. Utilizando modelagem farmacocinética populacional (popPK), um modelo semi-mecanístico capaz de descrever a farmacocinética plasmática e a distribuição cerebral da QTP administrada como FQ a animais hígdos e SCZ-like foi desenvolvido. O transporte bidirecional da QTP através da BHE foi parametrizado como  $CL_{in}$  e  $CL_{out}$ . Animais SCZ-like apresentaram uma redução significativa no transporte através da BHE ( $CL_{in}$ : 0,019 L/h/Kg e  $CL_{out}$ : 0,017L/h/Kg) em comparação com animais naïve ( $CL_{in}$ : 0,045 L/h/Kg e  $CL_{out}$ : 0,023 L/h/kg). Além disso,

demonstrou-se que quanto pior o desempenho do animal no PPI, mais comprometido está o transporte de influxo de QTP através da BHE, indicando que a penetração de APD como a QTP está diminuída na SCZ e pode contribuir para a resistência observada ao tratamento farmacológico da doença. Aumento da exposição cerebral à QTP foi observado em animais SCZ-like quando QLNC foi administrada. O modelo popPK foi então expandido para descrever as diferentes características da QLCN: liberação da QTP *in vivo* do nanocarreador no plasma ( $K_{rel\_FAST}$ :  $0,261\ h^{-1}$  e  $K_{rel\_SLOW}$ :  $0,00047\ h^{-1}$ ) e mecanismo de distribuição da QTP para os tecidos e cérebro governado pelo nanocarreador ( $CL_{in,nano}$ :  $0,067\ L/h/kg$ ). Para investigação da PD um método bioanalítico versátil por CLAE-MS/MS foi desenvolvido e validado para determinação simultânea de monoaminas (MNT): dopamina (DA), ácido 3-4-diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) em amostras de microdialisado cerebral. O método foi aplicado para monitorar as alterações de concentração de MNT em amostras de dialisado obtidas do mPFC de prole de animais hípidos e SCZ-like antes e após a administração de QTP 5 mg/kg i.v. *bolus* (FQ e QLNC). Alterações na linha de base da DA após administração do fármaco não foram significativas em animais SCZ-like administrados com FQ. Quando ratos SCZ-like receberam QLNC, observou-se um aumento dos níveis de DA semelhantes aos observados em animais hípidos. Modelo de resposta indireta semi-mecanístico popPK/PD desenvolvido permitiu entender como FQ e QLNC afetam as concentrações extracelulares de DA. Um aumento de cerca de três vezes de no valor de  $EC_{50}$  ( $1,75\ ng/mL$  para  $4,97\ ng/mL$ ) para a QTP foi observado em ratos SCZ-like em comparação com animais hípidos. QLNC não alterou os parâmetros PD, pois não foram observadas alterações no  $EC_{50}$  após administração dessa formulação. No entanto, como a LNC modula a exposição cerebral à QTP foi observado um aumento dos níveis de DA no mPFC mostrando a importância do componente farmacocinético na variabilidade do tratamento farmacológico da SCZ. A abordagem presente nesta tese é útil para entender possibilidades e limitações dessas nanoformulações no *delivery* cerebral de fármacos, permitindo utilizar dessa estratégia para melhorar o tratamento farmacológico da SCZ.

**Palavras-chave:** nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico, esquizofrenia, poli(i:c), modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia, *delivery* cerebral, modelo popPK, modelo popPK/PD

## ABSTRACT

### Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Model of Quetiapine Lipid Core Nanocapsules in a Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia

Schizophrenia (SCZ) is a debilitating psychiatric condition with a lifetime prevalence of 1% worldwide. The incidence of this psychic disorder is slightly higher in men than in women, and women have less severe symptoms and better prognosis. The high variability observed in chronic SCZ response to treatment may be partially related to blood-brain barrier (BBB) dysfunction and consequent alterations on antipsychotic drug transport to central nervous system (CNS). We hypothesized that limited drug delivery to CNS in SCZ patients could be associated with pharmacotherapy resistance and developed lipid core nanocapsules (LNC) aiming to improve drug targeting to the brain. Viewing to increasing the understanding of the role of this type of drug delivery systems in brain drug disposition, in the current study we developed a population pharmacokinetic/pharmacodynamic (popPK/PD) model capable of describing changes in QTP plasma and brain pharmacokinetics and dopamine levels in brain after drug administration in solution (FQ) or encapsulated (QLNC) to naïve and schizophrenia-like (SCZ-like) male and female rats. QLNC (1 mg/mL) were obtained by nanoprecipitation and presented average size of  $166 \pm 39$  nm, low polydispersity index ( $< 0.15$ ) and high encapsulation efficiency ( $93 \pm 1.38\%$ ). Neurodevelopmental model of SCZ induced by the administration of viral mimic polyinosinic–polycytidilic acid [poly(i:c)] to pregnant rats, which has face, construct and predictive validity, was used to produce the SCZ-like animals. Pregnant Wistar dams (GD15) received different i.v. *bolus* doses of poly(i:c). SCZ-like deficits in male and female adult offspring (PND75) were accessed by elevated plus-maze (EPM), pre-pulse inhibition of the startle response (PPI) and MK-801-induced hyperlocomotion in comparison to offspring of pregnant dams (GD15) that received the same i.v. *bolus* volume of saline (naïve animals). SCZ-like animals were treated with FQ and QLNC showing restoration of the PPI deficits only when drug encapsulated was used. For PK investigation, plasma and brain microdialysis samples (ventral hippocampus – HIP and medium prefrontal cortex -mPFC) were collected from male and female, naïve and SCZ-like animals following intravenous dosing with FQ (5 and 10 mg/kg) or QLNC (5 mg/kg). A significant reduction of the extent of QTP unbound brain distribution was observed in SCZ-like animals dosed with FQ formulation when compared to naïve offspring. Using population model based approach (popPK) a semi-mechanistic two-compartment model was identifiable both in blood and in the brain after administration of FQ formulation to naïve and SCZ-like rats. Bi-directional transport of QTP across the BBB was parametrized as  $CL_{in}$  and  $CL_{out}$ . SCZ-like animals presented a significant reduction in the rate of BBB transport ( $CL_{in}$ : 0.019

L/h/Kg; and  $CL_{out}$ : 0.017 L/h/Kg) in comparison to naïve animals ( $CL_{in}$ : 0.045 L/h/Kg and  $CL_{out}$ : 0.023 L/h/Kg). Using the PPI test it was possible to demonstrate that the greater reduction in PPI, the more compromised is the influx transport across BBB, indicating that the cerebral penetration of antipsychotics such as QTP is decreased in SCZ and may contribute to the resistance observed with pharmacological treatment. An increased brain exposition was observed in SCZ-like animals when QLNC was administered. The popPK model was expanded to describe different features of the QLNC formulation. The final model describes QTP *in vivo* release from QLNC in plasma ( $K_{rel_{FAST}}$ : 0.261 h<sup>-1</sup> and  $K_{rel_{SLOW}}$ : 0.00047 h<sup>-1</sup>) and support a mechanism of the LNC governing QTP distributing into brain and tissues ( $Q_{nano_{TISSUE/BRAIN}}$  0.067 L/h/Kg). For the PD investigation, a versatile method was developed and validated for simultaneous determination of the monoamine neurotransmitters (MNT) dopamine (DA), 3-4-dihydroxyphenilacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in rat brain microdialysate samples using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was applied for monitoring the concentration changes of MNT in microdialysate samples from mPFC of male and female naïve and SCZ-like animals before and after QTP 5 mg/kg i.v. *bolus* dosing as FQ and QLNC. Only DA showed differences from baseline after QTP dosing. Changes in DA baseline were not observed in SCZ-like animals after FQ dosing, however when the animals received QLNC formulation an increase in DA levels similar to that observed in naïve animals was observed. A semi-mechanistic popPK/PD indirect response model was developed allowing understanding how FQ and QLNC formulation affects DA concentrations in naïve and SCZ-like rats. SCZ status increased QTP  $EC_{50}$  values about three times in comparison to naïve animals (from 1.75 ng/mL to 4.97 ng/mL). Nanoencapsulation did not alter PD parameters, since no alterations were observed in  $EC_{50}$  after QLNC dosing. However, because LNC modulate QTP brain delivery and increase in DA levels in mPFC was observed, showing the importance of the pharmacokinetic component to overcome the variability observed in SCZ pharmacological treatment. The present model-based approach is useful to better understand the possibilities and limitations of these nanoformulation in drug delivery to the brain opening the possibility to use this approach to improve SCZ-treatment limited response rates.

**Keywords:** Lipid core nanocapsules; schizophrenia; poly(i:c) model of schizophrenia; quetiapine; microdialysis, brain delivery, popPK model, popPK/PD model.



# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1

### Material suplementar

Table S1. Summary of the statistical tests and outcomes used for the cytokine maternal plasma levels evaluation. ....93

Table S2. Summary of the statistical tests and outcomes for the behavioral analyses conducted in saline and poly(i:c) offspring. ....94

Table S3. Summary of the statistical tests and outcomes for the evaluation of quetiapine lipid core nanocapsules effect on PPI restoration in poly(i:c) animals. ....95

## CAPÍTULO 2

Table 1. Mass spectrometry and retention times for each analyte. ....111

Table 2. Calibration curve regression parameters. ....115

Table 3. Stability of MNTs in artificial cerebrospinal fluid. ....117

Table 4. Effects of 5 mg/kg QTP systemic injection in MNT exposure in naïve and poly(i:c) offspring. ....120

### Material suplementar

Table S1. Intra and inter-assay precision and accuracy of the method for determining DA in quality control samples. ....125

Table S2. Intra and inter-assay precision and accuracy of the method for determining DOPAC in quality control samples. ....126

Table S3. Intra and inter-assay precision and accuracy of the method for determining HVA in quality control samples.....127

Table S4. Intra and inter-assay precision and accuracy of the method for determining 5-HT in quality control samples. ....128

Table S5. Intra and inter-assay precision and accuracy of the method for determining 5-HIAA in quality control samples. ....129

### **CAPÍTULO 3**

Table 1. Pharmacokinetic parameters estimate of the final QTP model.....154

#### **Material suplementar**

Table S1. Pharmacokinetic parameters estimate for the external validation FQ model using probenecid dataset.....171

### **CAPÍTULO 4**

Table 1. Population pharmacokinetic parameters used in the PK/PD modeling.....187

Table 2. Table 2. Parameter estimates of the final PK/PD model.....192

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

**Figure 1.** Cytokine plasma levels after single poly(i:c) injection to pregnant dams (GD15). .....78

**Figure 2.** Effect of different poly(i:c) prenatal treatment doses on elevated plus maze.....80

**Figure 3.** Effects of different doses of poly(i:c) on sensorimotor gating assessed by the paradigm of prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response.....81

**Figure 4.** Locomotor responses of adult offspring exposed prenatally to saline or different doses of poly(i:c). .....82

**Figure 5.** Effects of FQ and QLNC treatment on prepulse inhibition of the acoustic startle response in poly(i:c) neurodevelopmental model of SC. ....83

### Material suplementar

**Figure S1.** Sex difference in acoustic startle response after a 120-dB pulse. ....91

**Figure S2.** Difference in acoustic startle response in a 120-dB pulse trial after administrations of different formulations. ....92

## CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Chemical structure of (A) dopamine - DA, (B) 3-4-dihydroxyphenilacetic acid - DOPAC, (C) homovanilic acid - HVA, (D) serotonin – 5-HT and (E) 5-hydroxyindolacetic acid - 5-HIAA.....105

**Figure 2.** Effect of QTP (5 mg/kg i.v. *bolus*) on extracellular levels of DA (A), DOPAC (B), HVA (C), 5-HT (D) and 5-HIAA (E) at the mPFC of naïve (solid symbols) and poly(i:c) exposed (empty symbols) offspring.....118

## CAPÍTULO 3

**Figure 1.** Deficit in sensorimotor gating assessed by the paradigm of prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response.....145

**Figure 2.** Schematic representation of the final QTP structural model for FQ and QLNC formulation.....147

**Figure 3.** Correlation between model predicted individual  $CL_{in}$  and  $CL_{out}$  and prepulse inhibition response of the naïve and poly(i:c) animals.....152

**Figure 4.** Visual predictive checks (VPCs) of the final population PK model for FQ and QLNC formulations stratified by total plasma, unbound plasma and the unbound brain stratified by naïve or SCZ-like rats. ....155

**Figure 5.** Simulated time course of FQ and QLNC in plasma and brain of naïve and SCZ-like rats.....156

**Figure 6.** Simulated QTP total plasma and unbound brain concentrations following QLNC with different  $K_{relSLOW}$  rates administration to SCZ-like rats.....157

## Material suplementar

**Figure S1.** Individual and population fitted total plasma concentration *versus* time profiles using the final popPK model for FQ and QLNC formulations.....167

**Figure S2.** Individual and population fitted unbound plasma concentration *versus* time profiles using the final popPK model for FQ and QLNC formulations.....168

**Figure S3.** Individual and population fitted unbound brain concentration *versus* time profiles using the final popPK model for FQ and QLNC formulations.....169

**Figure S4.** Goodness of fit plots for FQ formulation model .....170

**Figure S5.** Goodness of fit plots for QLNC formulation model .....170

**Figure S6.** Individual and population fitted total plasma and unbound brain concentration *versus* time profiles following QTP 10 mg/kg i.v. dosing 30 min after 30 mg/kg probenecid (PROB) i.v. dosing using the final popPK model for FQ as an external validation.....172

**Figure S7.** Goodness of fit plots for the external validation using the probenecid dataset.....173

## CAPÍTULO 4

**Figure 1.** Schematic representation of the full structural PK/PD model used to describe mPFC dopamine response after administration of FQ or QLNC formulation.....189

**Figure 2.** Simulated unbound brain concentration *versus* time profile of quetiapine after a single intravenous bolus dose of 5 mg/kg of FQ or QLNC formulations to naïve and SPR rats.....190

**Figure 3.** Observed and model-fitted dopamine concentrations in mPFC of naïve and SPR after administration of a single 5 mg/kg dose of FQ formulation intravenously.....191

**Figure 4.** Observed and model-fitted dopamine concentrations in mPFC of naïve and SPR after administration of a single 5 mg/kg dose of QLNC formulation intravenously.....193

**Figure 5.** Visual predictive checks (VPCs) of the final PK/PD model for naïve and SPR after administrations of FQ and QLNC formulations.....194

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA - 5-hydroxyindolacetic acid  
5-HT - serotonin  
ACF - artificial cerebrospinal fluid  
APD - antipsychotic drugs  
ASR - acoustic startle response  
BHE - barreira hematoencefálica  
BLK - blank lipid-core nanocapsules  
CSF - cerebrospinal fluid  
DA - dopamine  
DOPAC - 3-4-dihydroxyphenilacetic acid  
EPM - elevated plus maze  
FQ - quetiapine control formulation  
fT - fator de penetração tecidual  
GD - dia gestacional  
HVA - ácido homovanílico  
IL-10 - interleucina 10  
IL-6 - interleucina 6  
LCA - líquido cerebral artificial  
LNC - lipid core nanocapsules  
MIA - maternal immune activation  
MNT - monoamine neurotransmitters  
mPFC - medium prefrontal cortex  
PND - postnatal-day  
poly(i:c) - ácido poli-inosínico:policitidílico  
popPK/PD - modelo populacional farmacocinético/farmacodinâmico  
PPI - pre-pulse inhibition  
PT - pre-natal treatment  
QLNC - quetiapine lipid-core nanocapsules  
QTP - quetiapina  
SCZ - esquizofrenia  
SPR – schizophrenia phenotyped rat  
VEH - vehicle formulation





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	27
OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivo Geral .....	35
2.2. Objetivos Específicos .....	35
REVISÃO DE LITERATURA .....	37
3.1. Esquizofrenia: Aspectos Gerais.....	39
3.2. Diferenças Sexuais na Esquizofrenia.....	41
3.3. Status da Barreira Hematoencefálica em Transtornos Psicóticos .....	43
3.4. Modelos Animais de Esquizofrenia .....	46
3.5. Modelo Neurodesenvolvimental de Esquizofrenia por Ativação Imune Pré-Natal.....	49
3.6 Nanopartículas e <i>Delivery</i> de Antipsicóticos .....	53
3.7 Microdiálise como Ferramenta para Estudo da Distribuição Cerebral de Fármacos e Neurotransmissores .....	55
3.8 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica.....	57
CAPÍTULO 1 .....	65
CAPÍTULO 2 .....	97
CAPÍTULO 3 .....	131
CAPÍTULO 4 .....	175
DISCUSSÃO GERAL .....	201
CONCLUSÕES .....	217
REFERENCIAS GERAIS .....	221
ANEXOS .....	237



## INTRODUÇÃO

---



A esquizofrenia (SCZ) é uma condição psiquiátrica crônica, heterogênea e debilitante desencadeada por fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que interferem coletivamente com a maturação e o desenvolvimento normal do cérebro (INSEL, 2010; RAPOPORT, GIEDD & GOGTAY, 2012; MILLAN et al., 2016).

A SCZ acomete cerca de 1% da população mundial sendo normalmente diagnosticada em adultos jovens. Possui uma importante carga socioeconômica devido aos custos diretos e indiretos que decorrem da cessação de uma vida produtiva e independente e relacionado à assistência ao paciente durante a utilização de serviços hospitalares (INSEL, 2010; MILLAN et al., 2016).

O tratamento farmacológico da SCZ baseia-se principalmente no controle dos sintomas positivos da doença com o uso de antipsicóticos típicos, atípicos ou suas associações. Embora a importância desses tratamentos deva ser reconhecida, ainda existe uma alta variabilidade na resposta terapêutica: 60% dos pacientes respondem parcialmente e 30% são considerados resistentes ao tratamento com antipsicóticos (SUZUKI et al., 2011).

Além da alta variabilidade terapêutica, estudos publicados recentemente têm evidenciado diferenças importantes na fisiopatologia da esquizofrenia e na resposta ao tratamento farmacológico entre homens e mulheres (BALE & EPPERSON, 2015; HILL, 2016). No âmbito da pesquisa pré-clínica, porém, a utilização de fêmeas ainda é incomum em estudos para desenvolvimento de novos fármacos ou terapias com antipsicóticos, limitando a compreensão das alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas relacionadas às diferenças sexuais.

A alta variabilidade na resposta terapêutica pode estar associada a alterações na barreira hematoencefálica (BHE) causadas pela SCZ, como o aumento da expressão de transportadores de efluxo, por exemplo, que podem limitar a distribuição dos antipsicóticos para seu sítio de ação no sistema nervoso central (SNC). Relatos na literatura indicam que há uma forte influência reguladora do estrógeno na expressão de transportadores na BHE de ratos Wistar, podendo haver uma alteração dos mesmos em estados patológicos como a esquizofrenia (MORRIS; LEE; PREDKO, 2003). Essa

influência poderia resultar em alterações na penetração cerebral de fármacos antipsicóticos em fêmeas em comparação com machos.

A utilização de diferentes tipos de nanocarreadores de fármacos como nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas é uma estratégia promissora que poderia contribuir para melhorar o *delivery* cerebral de antipsicóticos devido a capacidade desses sistemas de modular a farmacocinética e a distribuição tecidual de fármacos (ABBOTT et al., 2010; GABATHULER, 2010; LINDQVIST et al., 2013).

O grupo de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) desenvolveu e tem estudado extensivamente uma formulação de nanocarreadores poliméricos composta por uma dispersão de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico e monoestearato de sorbitana envelopados por uma parede polimérica formada de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e recoberta com polissorbato 80: as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNCs) (JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011; JORNADA et al., 2012; FIEL et al., 2014).

Utilizando a quetiapina (QTP), antipsicótico atípico de 2ª geração como fármaco modelo, obtivemos nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico com o fármaco (QLNC) e avaliamos o *delivery* cerebral em ratos Wistar machos saudáveis. Os resultados demonstraram que as QLNC foram capazes de alterar a farmacocinética plasmática da QTP administrada por via intravenosa, promovendo uma redução significativa no *clearance* total do fármaco e consequentemente um aumento significativo da meia-vida e da área sob a curva plasmática (ASC), quando comparado com a mesma dose do fármaco administrada em solução (CARREÑO, 2016a).

Através da técnica de microdiálise cerebral, que permite determinar as concentrações farmacologicamente ativas na biofase, demonstramos que as QLNCs atravessam a membrana luminal da BHE carregando a QTP, não permitindo que o fármaco nanoencapsulado interaja com os transportadores de efluxo (CARREÑO et al., 2016b). Esse fato foi evidenciado pela diferença significativa no fator de penetração hipocampal quando o fármaco foi administrado em solução ( $fT = 1,55 \pm 0,17$ ) ou nanoencapsulado ( $fT = 0,88 \pm 0,21$ ) na ausência e na presença da probenecida ( $fT_{\text{solução}} = 0,94 \pm 0,15$  e  $fT_{\text{QLNC}} = 0,92 \pm 0,13$ ), um inibidor do transportador de influxo.

Na investigação da penetração cerebral da QTP nos estudos conduzidos previamente (CARREÑO, 2016a; 2016b), no entanto, foram utilizados ratos machos sadios. Desse modo, as alterações causadas na BHE tanto pela SCZ quanto pelas diferenças de gênero e, conseqüentemente, na distribuição cerebral do fármaco não foram investigadas. Além disso, a exposição hipocampal à QTP livre nos animais sadios que receberam o fármaco nanoencapsulado ( $ASC_{0-6h} = 259 \pm 62 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}/\text{kg}$ ) foi semelhante à determinada nos animais que receberam o fármaco em solução ( $ASC_{0-6s} = 224 \pm 51 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}/\text{kg}$ ), apesar de termos determinado aumento das concentrações cerebrais totais ( $ASC_{0-8h}$  de  $3,47 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$  para  $5,94 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ ) com o uso da QLNC. Embora sem quantificação, observou-se que os animais que recebiam as QLNC apresentavam efeito sedativo mais pronunciado do que os animais que recebiam o fármaco em solução, indicando a necessidade de determinação das concentrações livres da QTP em outras regiões cerebrais. Essas questões em aberto justificam a continuidade dos estudos com as QLNC em modelo animal capaz de mimetizar as alterações neuronais e os padrões comportamentais observados em pacientes esquizofrênicos, bem como investigar se o sexo pode alterar o padrão de distribuição do fármaco, tanto livre quando nanoencapsulado, nesse modelo de SCZ.

O modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia por injeção intravenosa de ácido poli-inosínico:policitidílico [poli(i:c)] a ratas prenhas (ZUCKERMAN et al., 2003; ZUCKERMAN & WEINER, 2005; PATRICH et al., 2016) resulta em filhotes que na idade adulta apresentam um fenótipo neurobiológico e comportamental muito semelhante ao observado na SCZ humana (PATRICH et al., 2016; PIONTKIEWITZ, ARAD & WEINER, 2011). Esse modelo pré-clínico é considerado preditivo e confiável, podendo ser utilizado na investigação da disposição cerebral e efeito antipsicótico de fármacos e na extrapolação da investigação de novas estratégias terapêuticas farmacológicas (MÖLLER, SWANEPOEL & HARVEY, 2015).

Uma melhor compreensão da relação concentração livre versus efeito farmacológico nos locais-alvo do SNC é fundamental para o entendimento e desenvolvimento de novas terapias farmacológicas que sejam efetivas para doenças como a SCZ já que, ainda hoje, há uma escassez de informações sobre essas relações (SRINIVAS; MAFFUID; KASHUBA, 2018).

A modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (modelagem PK/PD) é uma ferramenta matemática e estatística que objetiva estabelecer relações entre a exposição (PK) e o efeito (PD) de um fármaco e que tem sido cada vez mais utilizada para caracterizar e prever o curso temporal das respostas farmacodinâmicas tanto em estudos pré-clínicos quanto em estudos clínicos (DANHOF et al., 2008, HURTADO et al., 2014; ZIMMERMANN et al., 2015)

Através do desenvolvimento de um modelo PK/PD populacional (modelo popPK/PD) é possível investigar as fontes de variabilidade dos parâmetros farmacocinético e do efeito farmacodinâmico intra e inter-indivíduos, tais como condições patológicas, massa corporal, sexo, idade, entre outros, que causam alterações na resposta terapêutica, permitindo uma melhor compreensão da relação entre esses fatores e a exposição/efeito do fármaco (ZHOU et al., 2015). Além disso, os modelos popPK/PD permitem descrever, simular e prever o efeito farmacológico em função do tempo resultante de um regime posológico adotado em indivíduos saudáveis ou em uma condição patológica como a SCZ, como no presente caso, levando em consideração a variabilidade entre os indivíduos da população estudada (BARBOUR, SCALIONE & DERENDORF, 2010).

Os modelos popPK/PD pré-clínicos descritos na literatura para antipsicóticos utilizam dados de PK (concentrações de fármaco no plasma e no tecido cerebral) *in vivo* em animais saudáveis e dados de PD (ocupação de receptores dopaminérgicos, D2, e serotoninérgicos, 5-HT<sub>2A</sub>) *in vitro* para estabelecer uma relação temporal do efeito de fármacos como a risperidona e a olanzapina e realizar simulações para prever o efeito em humanos (JOHNSON et al., 2011, 2014; KOZIELSKA et al., 2012).

O desenvolvimento de um modelo popPK/PD para a QTP capaz de descrever a modulação da disposição livre cerebral do fármaco e o efeito farmacológico resultante da nanoencapsulação observados em modelo animal de esquizofrenia, tanto para machos quanto para fêmeas, representa uma estratégia inédita na literatura e permitirá determinar de que maneira os nanocarreadores modulam os parâmetros PK/PD desse antipsicótico, permitindo avaliar as vantagens do seu uso e gerando ferramenta importante para investigação de posologias eficazes para o fármaco.



## **OBJETIVOS**

---



## **2.1. Objetivo Geral**

Estabelecer um modelo popPK/PD capaz de descrever as alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas da quetiapina nanoencapsulada em um modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia em ratos Wistar machos e fêmeas.

## **2.2. Objetivos Específicos**

1. Implementar o modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia em ratos Wistar machos e fêmeas através da ativação imune pré-natal induzida por poly(i:c) nas condições do laboratório;
2. Validar metodologia bioanalítica para a quantificação dos neurotransmissores: dopamina, serotonina e seus metabólitos (ácido 3,4-diidroxifenilacético - DOPAC, ácido homovanílico - HVA e ácido 5-hidroxi-indolacético - 5-HIAA) por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS);
3. Avaliar comparativamente a farmacocinética plasmática e a distribuição cerebral da QTP, através de microdiálise hipocampal e cortical, em ratos Wistar machos e fêmeas com esquizofrenia experimental após administração intravenosa do fármaco em solução e encapsulado na LNC;
4. Estabelecer modelo populacional (popPK) para descrever a farmacocinética plasmática e cerebral (córtex pré-frontal e hipocampo) da QTP em animais saudáveis e em animais do modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia após administração do fármaco em solução ou nanoencapsulado (QLNC);

5. Investigar, por microdiálise cerebral, as alterações nos níveis intersticiais corticais de dopamina, serotonina e seus metabólitos de ratos Wistar machos e fêmeas saudáveis e com esquizofrenia experimental após a administração intravenosa de QTP em solução e encapsulado na LNC;
6. Estabelecer um modelo popPK/PD capaz de descrever as alterações na farmacocinética plasmática, na distribuição cerebral e na resposta à quetiapina livre e nanoencapsulada administrada a ratos Wistar machos e fêmeas saudáveis e em animais do modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia.

Os objetivos específicos desta tese foram organizados na forma de quatro capítulos que correspondem a artigos científicos e incluem uma breve revisão de cada tema, materiais e métodos, resultados e discussão. Os artigos encontram-se na sequência do texto da seguinte maneira:

**Capítulo 01:** “Quetiapine lipid core nanocapsules restore prepulse inhibition deficits in a neurodevelopmental model of schizophrenia in male and female rats”, que reúne resultados referentes ao objetivo específico 1.

**Capítulo 02:** “A versatile LC-MS/MS method for determination of neurotransmitters in microdialysis samples applied to investigate the effect of quetiapine in schizophrenic like animals” que reúne resultados referentes aos objetivos específicos 2.

**Capítulo 03:** “Semi-mechanistic pharmacokinetic modeling of lipid core nanocapsules: understanding quetiapine plasma and brain disposition in a neurodevelopmental animal model of schizophrenia”, que reúne resultados referentes aos objetivos específicos 3 e 4.

**Capítulo 04:** “Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of cortical dopamine levels after quetiapine lipid core nanocapsules administration to schizophrenia phenotyped rat”, proposta preliminar de artigo que reúne resultados referentes aos objetivos específicos 5 e 6.

**REVISÃO DE LITERATURA**

---



### 3.1. Esquizofrenia: Aspectos Gerais

A SCZ é um transtorno mental crônico e multifatorial caracterizado por distorções do pensamento, das emoções, da percepção de si mesmo e também por afetos inapropriados ou embotados (CANDIAGO et al., 2013; INSEL, 2010; KAHN; SOMMER, 2015; MILLAN et al., 2016; SILVA et al., 2017). Na nota descritiva Nº 397 publicada em 2016 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que a SCZ afeta mais de 21 milhões de pessoas em todo mundo, comprometendo consideravelmente o desempenho educativo e laboral do paciente, que sofre também com a estigmatização da doença e a discriminação social (SILVA et al., 2017).

Os portadores de SCZ apresentam sinais e sintomas característicos que podem ser classificados em “positivos”, “negativos” e “cognitivos”. As crises psicóticas recorrentes são o principal sintoma positivo e causam perda do contato com a realidade, principalmente através da desorganização do pensamento (transtorno do pensamento formal), alucinações visuais, auditivas, gustativas e táteis, bem como delírios do tipo paranóide. O conjunto de sintomas negativos caracteriza uma síndrome amotivacional representada por expressão emocional diminuída, isolamento social, incapacidade de sentir prazer (anedonia), perda da capacidade de tomada de decisões e ausência de força de vontade (abulia). Os sintomas cognitivos afetam o raciocínio e a aprendizagem, causando déficits de memória, função executiva e linguagem (SAHIN; DOOSTDAR; NEILL, 2016).

Até o momento não foi identificado nenhum marcador bioquímico ou teste laboratorial para diagnosticar a SCZ (LAI et al., 2016). O diagnóstico da esquizofrenia é baseado em critérios estabelecidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria e na Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID), publicado pela OMS. Esses critérios consideram a presença e a duração de sintomas positivos, negativos e cognitivos e também o impacto desses sintomas na vida social e ocupacional do paciente. São consideradas, ainda, as associações com outras condições psiquiátricas, transtornos de humor e até mesmo a utilização de drogas de abuso.

Devido a sua alta complexidade, a SCZ pode ser classificada em diferentes subtipos clínicos, sendo os principais: *paranóide*, com predomínio de delírios persecutórios e alucinações; *hebefrênico*, também chamado de desorganizado, em que predominam os distúrbios afetivos do tipo inapropriado ou pueril; *catatônico*, com sintomas de rigidez, esturpor ou agitação psicomotora; *indiferenciado*, predomínio de comportamento incoerente e desorganizado associado a delírios e alucinações; *residual*, com predominância de sintomas negativos.

O tratamento clínico da esquizofrenia é realizado através de duas frentes de ação: a psicoterapia e o tratamento farmacológico. O acompanhamento psicoterápico busca a reabilitação psicossocial do paciente, o resgate da autonomia, individualidade e da capacidade de socialização (KRAUSE et al., 2018).

O tratamento farmacológico é direcionado para o controle dos sintomas positivos da doença através do uso de medicamentos antipsicóticos típicos (AP<sup>TÍPICOS</sup>), como haloperidol, flufenazina, clorpromazina e tioridazina; e antipsicóticos atípicos (AP<sup>ATÍPICOS</sup>), como clozapina, risperidona, quetiapina, olanzapina e aripiprazol (ASSION et al., 2018). O tratamento crônico com esses medicamentos pode causar rigidez, distonia e discinesia (AP<sup>TÍPICOS</sup>) ou aumentar o risco de desenvolvimento de doenças como obesidade, hiperlipidemia e diabetes tipo II (AP<sup>ATÍPICOS</sup>) resultando muitas vezes em falta de adesão ao tratamento (LAPPIN et al., 2018; PEREIRA, BUDOVICH & CLAUDIO-SAEZ, 2018; URBAN; CUBAŁA, 2017). Além disso, o tratamento com antipsicóticos falha em aproximadamente um terço dos pacientes diagnosticados com SCZ, mesmo quando os medicamentos são utilizados de maneira correta e nas doses e frequências de administração adequadas (GILLESPIE et al., 2017; SUZUKI et al., 2011; VOLPE et al., 2017).



### 3.2. Diferenças Sexuais na Esquizofrenia

É sabido que homens e mulheres apresentam diferenças significativas no risco, desenvolvimento e evolução da esquizofrenia (ABEL, DRAKE & GOLDSTEIN, 2010; GOGOS et al., 2015; MARKHAM, 2012; OCHOA et al., 2012). A incidência do transtorno é ligeiramente maior em homens do que em mulheres (razão 1,4: 1), existindo diferença significativa na idade média de início do primeiro surto psicótico, que ocorre geralmente entre 18-24 e entre 22-28 anos em homens e mulheres, respectivamente (GOGOS et al., 2015). Geralmente, homens apresentam sintomas mais severos e um pior prognóstico da doença do que mulheres. Além disso, apenas em mulheres há uma segunda idade de pico de incidência que ocorre entre 45-49 anos e um maior risco de desenvolvimento de SCZ na faixa etária entre 50-70 anos (SUN et al., 2016). Além disso, após o primeiro surto psicótico as mulheres apresentam um melhor curso social da doença, ou seja, tendem a manter-se no emprego, apresentam menor número de hospitalizações e menores chances de isolamento social quando comparadas com homens nas mesmas condições (OCHOA et al., 2012)

Essas diferenças entre os sexos levaram ao surgimento da hipótese estrogênica da SCZ, que atribui aos hormônios ovarianos, especialmente aos estrogênios, um papel protetor no desenvolvimento da doença em mulheres (MARKHAM, 2012). Durante a puberdade, a menarca marca o aumento da produção de estrogênios que podem contribuir para o atraso no surgimento dos primeiros sintomas da doença em mulheres em comparação com os homens (MCGREGOR; RIORDAN; THORNTON, 2017). Kiliçaslan e colaboradores (2014), em seu estudo com 289 pacientes diagnosticadas com SCZ, encontraram uma associação inversamente proporcional entre a idade do primeiro surto psicótico e a idade da menarca. Além disso, o segundo pico de incidência de SCZ ocorre apenas em mulheres e no período da menopausa, onde há uma rápida redução dos níveis de estrógeno e progesterona (GOGOS et al., 2015; SUN et al., 2016). Mulheres diagnosticadas com SCZ no período pré-menopausa apresentam um melhor prognóstico da doença e respondem melhor ao tratamento com antipsicóticos, necessitando de doses menores dos

fármacos, quando comparadas com mulheres mais velhas ou homens portadores de SCZ (ABEL, DRAKE & GOLDSTEIN, 2010).

Em estudo realizado por Huber e colaboradores (2004) os hormônios sexuais estradiol, progesterona, prolactina e hormônio luteinizante foram dosados em amostras de sangue coletadas de um grupo de 50 mulheres internadas por surto psicótico, sendo 23 delas diagnosticadas com SCZ, ficou evidente que as taxas de recaída e o número de hospitalizações foram maiores durante períodos de flutuação de estrogênio, por exemplo, durante o início da fase folicular do ciclo menstrual, após o parto ou no período pós-menopausa (RUBIN et al., 2010).

Embora seja evidente a relação entre os níveis de estrogênios e a ação protetora contra o desenvolvimento de SCZ em mulheres, outro fator importante que explica a idade precoce e a maior incidência de SCZ em homens é a exposição à testosterona, que pode ser considerada um fator de risco para a doença (MARKHAM, 2012). A testosterona e a desidroepiandrosterona (DHEA) possuem papel no neurodesenvolvimento, pois influenciam a conectividade sináptica e a diferenciação neuronal (MELCANGI, PANZICA & GARCIA-SEGURA, 2011). Em seu estudo de meta-análise, Misiak e colaboradores (2018) encontraram níveis elevados de DHEA em todos os grupos de pacientes esquizofrênicos analisados. Considerando apenas os pacientes em primeiro surto psicótico, há uma elevação com os níveis de testosterona livre, mas não de testosterona total. Além disso, pacientes em recidiva aguda apresentam níveis significativamente mais altos de testosterona total que também estavam elevados em pacientes do sexo feminino com múltiplos episódios de crises psicóticas. Os autores concluíram que existem mudanças dinâmicas dos níveis de testosterona e DHEA em pacientes com esquizofrenia e que esses podem ser mecanismos ativados em resposta ao estresse associado à experiência de psicose aguda.

Apesar das diferenças sexuais relacionadas à SCZ serem passíveis de serem reproduzidas em modelos animais, ainda existem poucos estudos, principalmente relacionados a alterações na farmacocinética e farmacodinâmica de terapias farmacológicas para a SCZ, que incluem fêmeas em suas análises e, quando incluem, utilizam um número amostral reduzido o

que acaba não tendo relevância significativa na interpretação dos resultados, não permitindo que as diferenças sexuais sejam adequadamente exploradas.

Apesar de alguns autores justificarem a ausência de fêmeas nos estudos alegando que a expressão do fenótipo é mais forte nos machos, essa estratégia parece ser uma boa alternativa apenas do ponto de vista da redução de custos experimentais. O desenvolvimento de estudos comparativos em ambos os sexos permite decifrar as complexas alterações que ocorrem no neurodesenvolvimento de machos e fêmeas, permitindo um delineamento de novas estratégias terapêuticas direcionadas e, portanto mais eficientes.

### 3.3. Status da Barreira Hematoencefálica em Transtornos Psicóticos

Alterações patológicas na BHE estão bem descritas e são reconhecidas como um fator central para o desenvolvimento de uma série de distúrbios neurológicos, por exemplo, a esclerose múltipla (BELL et al., 2018), o acidente vascular cerebral (ZHANG et al., 2018) e a epilepsia (VAN VLIET, ARONICA & GORTER, 2015).

Entretanto, a relação entre a BHE e os transtornos psicóticos como a SCZ recebeu menos atenção e somente com o avanço das técnicas para detecção de biomarcadores em amostras biológicas, dos exames de imagem (RM, PET Scan) e das bases imunológicas da SCZ, que ocorreu nas últimas duas décadas, é que houve um aumento dos esforços para entender o papel desta barreira biológica no transtorno (POLLAK et al., 2018). De maneira geral, mudanças patológicas na BHE podem incluir: aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de conteúdo do interstício cerebral para a circulação sistêmica ou de proteínas plasmáticas para o interstício; expressão alterada de canais iônicos e transportadores de efluxo ou influxo nas células endoteliais e gliais; alterações em claudinas e integrinas que formam as zônulas de oclusão; e aumento da transmigração de leucócitos (POLLAK et al., 2018; TENREIRO et al., 2016). Essas alterações causam perturbações da homeostase cerebral e podem afetar diretamente a sinalização neuronal. Porém, não existe até o momento nenhum estudo conclusivo que evidencie se as alterações de BHE são causa ou ocorrem em consequência à disfunção dos neurônios descrita para a SCZ (POLLAK et al., 2018).

As evidências de comprometimento da BHE em transtornos psicóticos têm sido comprovadas através do estudo de biomarcadores no líquido (LCR), na circulação sistêmica (biomarcadores séricos), através da análise *post mortem* de cérebros de pacientes esquizofrênicos e também, por estudos de neuroimagem *in vivo*.

A técnica considerada padrão ouro para avaliar a permeabilidade das barreiras cerebrais em seres humanos é o coeficiente de albumina (AlbQ), que consiste na razão entre a concentração de albumina (Alb) presente no LCR e a concentração sérica desta proteína. Em indivíduos saudáveis a concentração de Alb no LCR é aproximadamente 200 vezes menor do que no sangue.

Estudo realizado por Endres e colaboradores (2015) analisou 180 amostras de LCR obtidas de pacientes psicóticos e encontrou uma elevação no número de leucócitos, um aumento da concentração de proteínas totais e um AlbQ elevado para os pacientes com diagnóstico de esquizofrenia. Valores semelhantes foram obtidos em um estudo anterior realizado por Bechter e colaboradores (2010) com amostras de LCR coletadas de 63 pacientes, sendo 24 pacientes com transtornos afetivos e 39 pacientes com esquizofrenia. Dentre os pacientes esquizofrênicos, 23% apresentaram AlbQ aumentado o que poderia ser indicativo de aumento de permeabilidade através da BHE. No entanto, um aumento no AlbQ também pode estar relacionado com uma diminuição na taxa de renovação do LCR, aumento da resistência do fluxo subaracnoideo ou bloqueio das vilosidades do tecido aracnóideo que podem causar um redução do *clearance* de proteínas do LCR para o sangue venoso (BECHTER et al., 2010)

Apesar de estudos *post mortem* com cérebros de pacientes esquizofrênicos possuírem uma série de limitações devido ao reduzido número de amostras, falta de casos controle adequados e normalmente envolverem amostras de pacientes que estavam em tratamento com antipsicóticos (POLLAK et al., 2018), através deles é possível evidenciar alterações de microvasculatura que podem estar relacionados de forma direta com um padrão anormal de estruturação da BHE em pacientes SCZ. Harris e colaboradores (2008) obtiveram amostras de córtex pré-frontal (PFC) provenientes do cérebro de 12 pacientes esquizofrênicos e 12 casos-controle e isolaram a microvasculatura cerebral através de microdissecação a laser.

Através da análise de RNA os autores concluíram que houve um *downregulation* em genes envolvidos com transporte de íons, adesão e proliferação em células endoteliais da microvasculatura cerebral de pacientes esquizofrênicos quando comparados com os controles. Outros estudos também demonstraram redução no número de oligodendrócitos e redução no número de astrócitos adjacentes aos capilares que formam a BHE em diferentes regiões cerebrais, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, a partir de autópsias realizadas em cérebros de pacientes esquizofrênicos comparados com seus respectivos controles (VOSTRIKOV; ORLOVSKAYA; URANOVA, 2008; WEBSTER et al., 2001).

Considerando que grande porcentagem dos antipsicóticos atualmente prescritos para o tratamento de SCZ, tais como quetiapina, aripiprazol, olanzapina e paliperidona, é substrato para transportadores de influxo e efluxo na BHE (CARREÑO et al., 2016b; MOONS et al., 2011; WOLKING et al., 2015), alterações na expressão ou atividade desses transportadores poderia explicar, pelo menos de forma parcial, a resistência ao tratamento com antipsicóticos.

Bernstein e colaboradores (2016), em um estudo *post mortem* com tecido cerebral de 13 pacientes esquizofrênicos e nove casos controles avaliaram, através de imunohistoquímica quantitativa, a densidade numérica da expressão de glicoproteína-P (P-gp) em capilares da BHE obtidos de diferentes regiões cerebrais e não obtiveram nenhuma diferença significativa entre os dois grupos. Em contrapartida, De Klerk e colaboradores (2010), em estudo clínico com 10 pacientes portadores de SCZ utilizando a técnica de tomografia por emissão de prótons (PET Scan) e [<sup>11</sup>C]verapamil como substrato, foram capazes de quantificar a função da glicoproteína-P (P-gp) *in vivo*, demonstrando que a captação do verapamil foi reduzida no córtex, nos gânglios basais e na amígdala dos pacientes esquizofrênicos. Essa redução teve correlação com o aumento da atividade da P-gp nessas regiões cerebrais e, segundo os autores, pode ser um fator que contribui para a resistência aos antipsicóticos. Considerando as limitações na comparação entre os estudos de Bernstein e De Klerk é possível hipotetizar que, em pacientes portadores de SCZ, há uma alteração na atividade da P-gp, mas não em sua expressão.

Até o momento, no entanto, não há um completo entendimento das alterações da BHE na SCZ. Porém, já é possível perceber oportunidades para o desenvolvimento de estudos que contribuirão para a elucidação do papel da BHE na SCZ e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessa doença.

### 3.4. Modelos Animais de Esquizofrenia

A tentativa de modelar condições psiquiátricas em animais é muitas vezes vista com certo ceticismo pela comunidade científica (BOKSA, 2007; LOW & HARDY, 2007). A esquizofrenia, por ser considerada uma condição exclusivamente humana, é um caso particularmente ilustrativo dessa descrença, já que até o momento não pôde ser totalmente recriada em animais (CORRADI, 2011; REISINGER et al., 2015).

Entretanto, do ponto de vista da pesquisa pré-clínica, a modelagem animal oferece uma plataforma essencial para o entendimento da neurobiologia da SCZ atuando como uma ferramenta de monitoramento rápido de numerosos elementos relacionados com o surgimento e progressão da doença (WILSON; TERRY, 2010). Além disso, com uso de modelos confiáveis e preditivos torna-se possível avaliar a resposta a agentes terapêuticos e projetar novas terapias farmacológicas para o tratamento da doença (JONES, WATSON & FONE, 2011). É fundamental, portanto, que os modelos animais de SCZ apresentem a tríade de requisitos de validade: de face, de constructo e preditiva para que possuam um alto valor translacional (MEYER, 2014; NESTLER; HYMAN, 2010).

A validade de face representa o grau de homologia de sintomas entre o modelo animal e a condição humana que se pretende simular. Para a esquizofrenia, este é um grande desafio há ser enfrentado tendo em vista a natureza dos sintomas da doença, como alucinações e delírios, que até o momento não são possíveis de serem determinados em animais (LIPSKA & WEINBERGER, 2000; MARCOTTE, PEARSON & SRIVASTAVA, 2001; WILSON & TERRY, 2010). Pode-se, porém, estabelecer um paralelo entre sintomas e comportamentos que sabidamente possuem um impacto importante na doença em humanos e que são modelados com sucesso em animais.

Alterações do filtro sensorio motor, comportamento social prejudicado, déficits na inibição latente e disfunções cognitivas são características comportamentais capazes de serem modeladas em animais e que correspondem à sintomatologia da SCZ em humanos (BUHUSI et al., 2017; DODELL-FEDER, TULLY & HOOKER, 2015; GEYER, 2006). Modelos que utilizam hiperlocomoção induzida por afetaminas têm sido comumente descritos na literatura e mimetizam o tônus hiperdopaminérgico (BRISCH et al., 2014) e o comportamento estereotipado frequentemente descrito em pacientes esquizofrênicos (CALZAVARA et al., 2011; MAVRIKAKI; NOMIKOS; PANAGIS, 2010). Esses modelos são especialmente úteis na pesquisa pré-clínica para triagem de novos compostos com atividade antipsicótica (HERRMANN et al., 2014; HERRMANN et al., 2017). Além disso, a elevação da atividade locomotora devido à utilização de antagonistas dos receptores de glutamato (ROENKER et al., 2011; ZAVITSANOU et al., 2014) está baseada em alterações do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) observadas em análises *post mortem* de cérebros de pacientes com SCZ (RUBIO, DRUMMOND & MEADOR-WOODRUFF, 2012).

A replicação da neurobiologia subjacente aos sintomas da patologia humana no modelo animal é denominada validade de constructo (BELZUNG; LEMOINE, 2011; WILSON; TERRY, 2010). Novamente, para a SCZ esta é uma tarefa desafiadora, uma vez que, por sua característica multifatorial e complexa, os substratos neurobiológicos relacionados aos sinais e sintomas da doença ainda não estão claramente elucidados (KAHN & SOMMER, 2015). Entretanto, através de estudos *post mortem* ou de ressonância magnética *in vivo* é possível identificar anomalias estruturais e moleculares presentes em cérebros de pacientes com SCZ (JUNG et al., 2010; KAHN & SOMMER, 2015) e, ao modelar tais alterações em animais, torna-se possível estabelecer a validade de constructo necessária (LIPSKA & WEINBERGER, 2000; MARCOTTE, PEARSON & SRIVASTAVA, 2001; NESTLER & HYMAN, 2010). Na literatura estão descritos modelos onde foi possível mimetizar a desorganização neuronal do córtex pré-frontal (volume reduzido, distribuição laminar de neurônios alterada, elevada densidade neuronal) (BOLKAN, CARVALHO POYRAZ & KELLENDONK, 2016; BUCKLEY, 2005; SIMPSON & KELLENDONK, 2017), as alterações em neurônios GABAérgicos, a redução de

axônios e as alterações na expressão gênica de subunidades de receptores NMDA (BOGART & O'DONNELL, 2018; PRYTKOVA & BRENNAND, 2017), bem como o aumento dos ventrículos e a diminuição da massa cinzenta (LAZAR, NEUFELD & CAIN, 2011; WILSON & TERRY, 2010) presentes em pacientes portadores de SCZ.

A validade preditiva pode ser definida como o grau com que o modelo é capaz de demonstrar em animais a resposta farmacológica esperada em humanos e permitir prever a eficácia de um novo agente terapêutico (BELZUNG; LEMOINE, 2011; JONES; WATSON; FONE, 2011). A busca de compostos com potencial ação antipsicótica ou de novas estratégias de tratamento para a SCZ está baseada, principalmente, na capacidade que as substâncias possuem em modular os sintomas positivos da doença. Em animais isso pode ser demonstrado através do *screening* de compostos ou formulações em testes como inibição de sobressalto por pré-pulso, modelos de memória de trabalho e modelos envolvendo desafios com anfetamina (ANTONIO et al., 2016; DIMER et al., 2014; DIMER et al., 2015; FONSECA et al., 2015; HERRMANN et al., 2014, 2017; NEVES et al., 2017).

Um estudo realizado por Flores e colaboradores (2016) identificou aproximadamente 20 diferentes tipos de modelos animais de esquizofrenia, todos com suas vantagens e limitações. Esses modelos podem ser divididos, de acordo com a classificação proposta por Jones e colaboradores (2011), em quatro categorias gerais de indução: i) modelos do neurodesenvolvimento, como modelo de isolamento social, modelos de exposição pré-natal a toxinas ou compostos químicos (LODGE, 2013; REISINGER et al., 2015; SWANEPOEL; MÖLLER; HARVEY, 2017); ii) modelos farmacológicos, como modelo de sensibilização à anfetamina ou à fenciclidina (SAHIN; DOOSTDAR; NEILL, 2016); iii) modelos de lesão, como lesão neonatal do hipocampo ventral ou do córtex pré-frontal (BRADY, 2016; FLORES; MORALES-MEDINA; DIAZ, 2016); e iv) modelos de manipulação genética, como utilização de animais *knockout* para genes específicos que produziriam nos animais alterações cerebrais ou comportamentos tipo esquizofrênico (COBA et al., 2018; LEE et al., 2018; NAKAO et al., 2018; OKAZAKI et al., 2018).

A utilização dos modelos que envolvem manipulações farmacológicas em animais adultos ou ainda lesão de regiões cerebrais apresenta



desvantagens do ponto de vista etiológico e limitações devido à falta de alterações em sistemas neurais que irão refletir de forma mais precisa a fisiopatologia da SCZ (FLORES, MORALES-MEDINA & DIAZ, 2016; JONES, WATSON & FONE, 2011; WILSON & TERRY, 2010). Além disso, modelos que utilizam a manipulação de fatores de susceptibilidade genética, apesar de serem considerados uma ferramenta importante para estudos biológicos, não permitem a modificação de mais de um gene por geração, distanciando-se da etiológica genética da SCZ em humanos (HENRIKSEN; NORDGAARD; JANSSON, 2017)

No escopo desta revisão de literatura será discutido apenas o modelo neurodesenvolvimental por ativação imune pré-natal, com enfoque para a administração de poli(i:c) a ratas prenhas, que foi o modelo escolhido para o desenvolvimento do trabalho.

### 3.5. Modelo Neurodesenvolvimental de Esquizofrenia por Ativação Imune Pré-Natal

A utilização de modelos neurodesenvolvimentais de SCZ apresenta forte validade etiológica e podem produzir anormalidades em múltiplos circuitos neuronais, aproximando-os da fisiopatologia da doença (MEYER et al., 2005; WILSON; TERRY, 2010; HADAR et al., 2015a; HADAR et al., 2015b).

Modelos neurodesenvolvimentais de SCZ por ativação imune pré-natal em roedores desenvolveram-se baseados em estudos epidemiológicos realizados em humanos que correlacionam o risco aumentado de desenvolvimento da doença com indivíduos nascidos de mães que tiveram infecções durante o período gestacional. Esses modelos possuem validade de face, construto e preditiva bem estabelecidas na literatura (BROWN & DERKITS, 2010; BROWN, 2012; KHANDAKER et al., 2013; NIELSEN, BENROS & MORTENSEN, 2014; NIELSEN, LAURSEN & AGERBO, 2016; WEBER-STADLBAUER, 2017).

No contexto de estudos que mimetizaram em roedores os mecanismos fisiopatológicos da SCZ através da ativação imune pré-natal, uma série de exemplos bem sucedidos podem ser citados, como a exposição de ratas ou camundongas prenhas ao vírus *influenza* humano (FATEMI et al., 2002;

FATEMI et al., 2017; GARBETT et al., 2012; LANDREAU et al., 2012; MEYER, 2014; XIA et al., 2014), à endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) (BATINIĆ et al., 2016; DE SOUZA et al., 2015; RÉUS et al., 2017; SANTOS-TOSCANO et al., 2016), e ao poli(i:c), um RNA dupla fita sintético (ARSENAULT et al., 2014; MEYER, 2014; PATRICH et al., 2016; REISINGER et al., 2015; ROSE et al., 2017).

Em mamíferos o poli(i:c) atua como um potente agente imunoestimulante, pois mimetiza uma infecção por retrovírus de fita dupla através da ativação de receptores do tipo Toll-3 (MATSUMOTO & SEYA, 2008; ZAVITSANOU et al., 2014; REISINGER et al., 2015). A ativação destes receptores induz cascatas de sinalização celular relacionadas com processos infecciosos que geram um desbalanço entre citocinas pró-inflamatórias (ex. interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral: TNF- $\alpha$ , e interferons do tipo I: INF- $\alpha$  e INF- $\beta$  ) e anti-inflamatórias (ex. interleucina IL-10 e fator de crescimento TGF- $\beta$ ) na circulação sistêmica materna, na placenta e no líquido amniótico (MEYER, FELDON & YEE, 2009; ALTAMURA et al., 2013; FINEBERG & ELLMAN, 2013) e induzem respostas inflamatórias no cérebro do feto em desenvolvimento, como ativação microglial, alterações na maturação de oligodendrócitos e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (DEBNATH, VENKATASUBRAMANIAN & BERK, 2015), levando a distúrbios do neurodesenvolvimento que podem estar associados à doenças neuropsiquiátricas como SCZ e autismo (MEYER et al., 2005; RAPOPORT, GIEDD & GOGTAY, 2012; MEYER, 2014; HADAR et al., 2015a; KHANDAKER et al., 2015; PATRICH et al., 2016; MILLAR, BILKEY & WARD, 2017; DONEGAN, BOLEY & LODGE, 2018).

É importante ressaltar que, apesar do neurodesenvolvimento fetal ser comprometido de forma semelhante em ratos e camundongos, o nível de comprometimento é significativamente dependente do período gestacional escolhido, da dose de poli(i:c) utilizada e da via e frequência de administração utilizadas (LI et al., 2009; MEYER & FELDON, 2012).

Estudos revisados neste trabalho e que utilizaram a ativação imune pré-natal descrevem o período compreendido entre o 9º e o 17º dia gestacional como sendo a janela de tempo mais significativa para a obtenção de animais adultos com endofenótipo patológico que se assemelha à SCZ (MEYER et al.,

2005; PIONTKEWITZ, ARAD & WEINER, 2011; MEYER & FELDON, 2012; MEYER, 2014; HADAR et al., 2015a,b.; MATTEI, SCHWEIBOLD & WOLF, 2015). As doses de poli(i:c) relatadas na literatura variam entre 0,5 e 20 mg/kg (MEYER; FELDON, 2012; COBA et al., 2018), com administrações pela via intravenosa e intraperitoneal em dose única ou múltiplas doses (ARSENAULT et al., 2014; REISINGER et al., 2015). Porém, a avaliação pormenorizada dos resultados obtidos entre as diferentes combinações desses fatores encontra-se além do escopo desta revisão de literatura. Ninhadas adultas de roedores (ratos ou camundongos) que passaram por ativação imune pré-natal serão referidas nesta revisão como animais poli(i:c).

Alterações neuroquímicas e histopatológicas estão descritas para animais poli(i:c) em regiões cerebrais que se assemelham àquelas encontradas na SCZ em humanos (MATTEI, SCHWEIBOLD & WOLF, 2015).

Zuckerman e colaboradores (2003) demonstraram que ratos poli(i:c) (GD15, 4 mg/kg, i.v) na idade adulta (90 dias) apresentaram alterações histopatológica no hipocampo e giro denteado em comparação com animais controle de mesma idade, além de hiperatividade dopaminérgica medida em fatias estriatais do cérebro desses animais. Ozawa e colaboradores (2006), utilizando administrações repetidas de poli(i:c) (GD12-GD17, 5 mg/kg, i.p.) em camundongas prenhas obtiveram ninhadas que apresentaram aumento do *turnover* dopaminérgico e redução de receptores do tipo D<sub>2</sub> no estriado, déficits significativos no teste de inibição de sobressalto por pré-pulso e reconhecimento de objetos e atividade locomotora aumentada no desafio com metanfetamina. Alterações dos níveis basais de neurotransmissores em regiões cerebrais relevantes para a SCZ, medidos em amostras de homogeneizado de tecido, foram demonstradas por Winter e colaboradores (2009) após desafio imune com poli(i:c) (GD9, 5 mg/kg, i.v.). Camundongos poli(i:c) adultos (12 semanas) apresentaram aumento de dopamina e seus principais metabólitos (DOPAC e HVA) no globo pálido e no córtex pré-frontal e redução dos níveis de serotonina no hipocampo, núcleo accumbens e globo pálido sem que houvesse alterações significativas nos níveis de GABA.

No entanto, Bitanhirwe e colaboradores (2010) administraram poli(i:c) a camundongas prenhas (GD17, 5 mg/kg, i.v.) e obtiveram redução nos níveis de dopamina e glutamato no hipocampo e córtex pré-frontal, de GABA no

hipocampo e de glicina no córtex pré-frontal nas ninhadas em idade adulta (80 dias). Essas ninhadas apresentaram também déficits significativos em experimentos de interação social e inibição latente, comportamento estereotipado e aumento da atividade locomotora induzida por apomorfina, além de anedonia, medida através do teste de preferência à sacarose.

Hadar e colaboradores (2015), com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais e neurobiológicas ao longo do desenvolvimento do animal, utilizaram ratas Wistar prenhas (GD15) para o desafio imune com poli(i:c) (4 mg/kg, i.v.) e, a partir dessas fêmeas, obtiveram ninhadas poli(i:c) adolescentes (35 e 60 dias) e adultas (100 dias). Os autores demonstraram que o déficit pré-atencional, medido através da inibição de sobressalto por pré-pulso, surge apenas quando o animal atinge a idade adulta. Outro resultado bastante relevante, demonstrado pelos mesmos autores, está relacionado com as alterações de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens, globo pálido, putâmen caudado e hipocampo. Foi evidenciada uma atividade neuroquímica alterada no córtex pré-frontal medial e hipocampo dos ratos poli(i:c) já no período de adolescência, que persistiu na vida adulta, demonstrando um comprometimento precoce dessas estruturas cerebrais, enquanto que as alterações causadas pelo poli(i:c) no núcleo accumbens e globo pálido lateral aparecem apenas na idade adulta comprovando, portanto, a natureza desenvolvimental do modelo.

Crum e colaboradores (2017), através de imagens obtidas por ressonância magnética, demonstraram a evolução de anormalidades estruturais no cérebro de ratos poli(i:c) (GD15, 4 mg/kg, i.v.), evidenciando a redução de volume em regiões corticais, no hipocampo, amígdala, estriado, núcleo accumbens e ventrículos laterais em comparação com animais controle. Os resultados obtidos apresentam validade de construto robusta para achados clínicos de imagem descritos para indivíduos com alto risco clínico para desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como a SCZ (SATTERTHWAITE et al., 2016).

### 3.6 Nanopartículas e *Delivery* de Antipsicóticos

Apesar do tratamento com antipsicóticos atualmente disponíveis na clínica contribuírem para o controle dos sintomas positivos da esquizofrenia, a falha terapêutica continua sendo um problema bastante importante culminando na falta de controle dos sintomas da SCZ e impactando diretamente na vida útil e no convívio social dos pacientes.

Essa falta de resposta ao tratamento pode estar associada a não adesão, a tomadas irregulares da medicação, ao uso de doses excessivas ou insuficientes, ou ainda, devido a interrupções frequentes, abuso de drogas ou aos diversos efeitos adversos, extrapiramidais e metabólicos, que ocorrem durante a utilização dos antipsicóticos (BARRETO et al., 2009). Ainda, mecanismos fisiológicos ou patológicos associados à doença como polimorfismo genético, alterações morfológicas cerebrais relacionadas à SCZ, indução de enzimas do metabolismo hepático devido ao uso crônico da medicação e interação do fármaco com proteínas de efluxo como P-gp presente na BHE, contribuem para o desenvolvimento da resistência aos fármacos antipsicóticos, podendo resultar em ineficácia terapêutica (LÖSCHER & POTSCHKA, 2005).

Nesse contexto, esforços têm sido conduzidos no desenvolvimento de estratégias para aumentar a biodisponibilidade, melhorar o efeito terapêutico e ainda reduzir os efeitos colaterais decorrentes da utilização dessa classe de fármacos. O estudo da utilização de sistemas nanoestruturados (nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas) expandiu-se nos últimos anos, por ser uma estratégia bastante promissora para o *delivery* de antipsicóticos através da BHE. O tamanho nanométrico dessas partículas favorece o aumento da penetração cerebral de compostos farmacologicamente ativos melhorando, na maioria dos casos, sua eficácia terapêutica (FOND, MACGREGOR & MIOT, 2013; POLLAK et al., 2018).

Yasir e Sara (2014) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo haloperidol (SLNP-Hal), um antipsicótico típico bastante utilizado na clínica e que apresenta pronunciado efeito extrapiramidal. Os autores, após administrarem a formulação por via intranasal a ratos Wistar machos, observaram aumento da exposição cerebral ( $ASC_{\text{cérebro}}$ ) em homogeneizado de

tecido de aproximadamente 4 vezes quando comparado com o fármaco administrado em solução pela mesma via. Além disso, houve redução da exposição sistêmica ao fármaco. Essa estratégia permitiria a redução da dose do antipsicótico com redução de seus efeitos extrapiramidais.

Vieira e colaboradores (2016) desenvolveram nanocápsulas de clozapina com diferentes tipos de revestimentos (tween-80, quitosana e polietilenoglicol). Essas formulações foram testadas em ratos Wistar machos e os resultados demonstram que houve uma alteração do *clearance* total e do volume de distribuição do fármaco. Além disso, os animais apresentaram uma redução do comportamento estereotipado induzido por afentamina (AMP).

Utilizando ratos Wistar machos adultos, Dimer e colaboradores (2014, 2015) avaliaram os efeitos adversos, o perfil farmacocinético e a atividade antipsicótica das nanocápsulas de núcleo lipídico de olanzapina (OLA-LNC), demonstrando que os animais tratados com OLA-LNC apresentaram ganho de peso e níveis de colesterol total significativamente menores, aumentaram a exposição plasmática ao fármaco e diminuíram o comportamento estereotipado induzido por AMP.

Patel e colaboradores (2011) propuseram uma formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo risperidona (SLN-Ris) para ser utilizada por via intranasal com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco, devido ao seu elevado metabolismo de primeira passagem, evitar que a Ris sofresse ação da P-gp presente na BHE e aumentar a biodistribuição cerebral (*targeting* para o cérebro). Os autores observaram aumento da exposição cerebral quando as SLN-Ris foram administrada por via intranasal a ratos Wistar machos em comparação com o fármaco administrado em solução.

Nosso grupo de pesquisa produziu (CARREÑO et al., 2015), através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com núcleo lipídico composto por triglicerídeos de cadeia média (cáprico e caprílico) e monoestearato de sorbitano contendo quetiapina na concentração de 1 mg/mL (QLNC). Através da aplicação de um algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2012) demonstramos que o fármaco se encontra majoritariamente disperso no núcleo e na parede polimérica da nanopartícula. O alto teor obtido para a formulação (~98%) além da alta eficiência de encapsulação obtida (~95%) corroboram os dados obtidos a partir

da aplicação do algoritmo (CARREÑO et al., 2016b). Além disso, em um estudo realizado com homogeneizado de tecido cerebral e hepático observamos um aumento da exposição à QTP em ambos os tecidos após administração de QLNC na dose de 5 mg/kg pela via intravenosa, em comparação com o fármaco administrado em solução (CARREÑO et al., 2016a).

O conjunto desses resultados demonstra que a utilização de nanopartículas apresenta grande potencial como nova estratégia terapêutica para o tratamento de SCZ, pois permite modular a farmacocinética e a farmacodinâmica de fármacos antipsicóticos.

### 3.7 Microdiálise como Ferramenta para Estudo da Distribuição Cerebral de Fármacos e Neurotransmissores

A microdiálise cerebral consiste na implantação de uma pequena sonda na região cerebral de interesse. A parte da sonda que fica em contato direto com o interstício cerebral contém uma membrana semipermeável, de *cutoff* definido, que é constantemente perfundida, a um fluxo baixo e constante (0.5 – 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) com líquido cerebral artificial (LCA) (DARVESH et al., 2011; ZESTOS; KENNEDY, 2017). No local de implantação da sonda, cria-se um gradiente de concentração que permite a difusão e coleta no microdialisado de moléculas de baixo peso molecular tanto endógenas, como os neurotransmissores e seus metabólitos, como exógenas, como a fração livre - farmacologicamente ativa - de fármacos que atravessaram a BHE e atingiram o parênquima cerebral. Através da microdiálise cerebral é possível avaliar as alterações nos sistemas de neurotransmissores (dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico) resultantes da administração de fármacos, bem como o próprio fármaco no mesmo local.

Shilliam e colaboradores (2005) utilizaram a microdiálise cerebral em ratos para avaliar o efeito do tratamento oral agudo (10 mg/kg) e crônico (21 dias) com o antipsicótico clozapina no sistema dopaminérgico do núcleo accumbens. Os autores concluíram que o fármaco promove alterações tempo-dependente do sistema dopaminérgico na região investigada e que esta

poderia ser uma das explicações para a demora no surgimento da atividade antipsicótica exercida pelo fármaco.

Yamamura colaboradores (2009), buscando elucidar o mecanismo de ação da QTP, avaliaram por microdiálise os níveis extracelulares de norepinefrina, dopamina, serotonina, GABA e glutamato no córtex pré-frontal de ratos. Os resultados obtidos demonstram que, após administração de QTP nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg pela via intraperitoneal, há uma elevação significativa dos níveis extracelulares de norepinefrina, dopamina e glutamato, sem que haja alterações nos níveis de serotonina e GABA na região cerebral investigada.

A microdiálise também tem sido utilizada para avaliação do *delivery* cerebral de fármacos inclusos em nanopartículas. Trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (FREDDO, 2009) utilizou a técnica de MD cerebral para avaliar de forma comparativa a distribuição do ácido valpróico no córtex frontal de ratos Wistar quando o fármaco foi administrado em solução ou em uma formulação de nanocápsulas revestidas com quitosana. As nanocápsulas revestidas com quitosana promoveram um aumento de cinco vezes no fator de penetração cerebral do ácido valpróico em comparação com a penetração observada quando o fármaco foi administrado em solução.

Lindqvist e colaboradores (2013) desenvolveram uma formulação de lipossomas peguilados conjugados com glutathione contendo DAMGO e avaliaram em ratos a distribuição cerebral desse peptídeo quando administrado encapsulado ou em solução. Os autores observaram um aumento significativo da exposição cerebral ao composto bem como um prolongamento do efeito antinociceptivo quando o peptídeo foi administrado na nanoformulação.

A microdiálise cerebral também pode ser utilizada para investigar o efeito da modulação de proteínas transportadoras de influxo e efluxo e expressas na BHE. Postchka e colaboradores (2002), utilizando microdiálise cerebral em ratos e verapamil, inibidor não seletivo da P-gp, demonstraram que a distribuição de fenobarbital, lamotrigina e felbamato para o parênquima cerebral sobre efeito significativo do efluxo pela P-gp.

Recentemente relatamos, utilizando a microdiálise cerebral em ratos Wistar machos que tiveram os transportadores de influxo sensíveis a probenecida inibidos, que as QLNCs atravessam a membrana luminal da BHE



carreando a QTP, não permitindo que o fármaco nanoencapsulado interaja com os transportadores de influxo presentes na barreira (CARREÑO et al., 2016b).

Apesar do exposto, nenhum trabalho publicado até o momento utilizou a microdiálise para avaliar as alterações promovidas por nanopartículas contendo fármacos antipsicóticos nos níveis intersticiais de neurotransmissores, nem o comportamento farmacocinético de distribuição cerebral de antipsicóticos em modelos animais de SCZ.

### 3.8 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica

A farmacometria é uma área da ciência aplicada que, no desenvolvimento de fármacos, busca quantificar o efeito farmacológico através da utilização de modelagem matemática e simulações (MM&S) de perfis de concentração de fármaco *versus* tempo (PK), efeito farmacológico (PD), da (pato)fisiologia dos sistemas biológicos e de como estes interatuam. Esta abordagem constitui uma importante ferramenta para integrar conhecimentos e permitir a tomada de decisões racionais durante o desenvolvimento pré-clínico, translacional e clínico de fármacos (MOULD; UPTON, 2012; RIGGS; CREMERS, 2019).

Modelos farmacocinéticos populacionais (popPK) são utilizados para descrever estudos farmacocinéticos nos quais dados individuais de uma população são avaliados utilizando modelos não lineares de efeito misto. Essa abordagem tem como objetivo principal encontrar parâmetros farmacocinéticos e suas fontes de variabilidade em uma determinada população (MOULD; UPTON, 2013) e com isso elucidar o impacto de diversos fatores individuais que usualmente afetam a farmacocinética.

Modelos não lineares referem-se ao fato de que a variável dependente (ex.: concentração plasmática de fármaco) está relacionada de maneira não linear com os parâmetros do modelo e com as variáveis independentes. Os efeitos mistos referem-se à parametrização do modelo e podem ser divididos em: (i) efeitos fixos - parâmetros que não variam entre os indivíduos da população e, (ii) efeitos aleatórios - parâmetros que variam entre os indivíduos de dada população (MOULD; UPTON, 2012).

Durante o desenvolvimento de um modelo farmacocinético populacional devem ser considerados cinco aspectos principais: (i) conjunto de dados; (ii) modelo estrutural, que descreve o perfil de concentração *versus* tempo típico para uma população; (iii) modelo estatístico, que está relacionado com a variabilidade no perfil de concentração típico dentro da população (ex.: variabilidade interindividual, variabilidade inter-ocasião); (iv) modelo de covariáveis, que explica a variabilidade através de características dos indivíduos (ex.: peso, altura, parâmetros fisiológicos, etc); (v) software utilizado na modelagem, que são capazes de integrar os dados e os modelos de forma conjunta e, através de distintos métodos de estimação de parâmetros para a parte estrutural, estatística e de covariáveis, descrever os dados (MOULD; UPTON, 2013; RIGGS; CREMERS, 2019).

Além disso, a integração de modelos farmacocinéticos populacionais (popPK) com dados de farmacodinâmica (PD) através da construção de modelos popPK/PD permite prever a variação do efeito farmacológico em relação a variação da concentração do fármaco no organismo em função do tempo. Desta forma, é possível relacionar exposição ao fármaco e resposta, obtendo um entendimento ainda mais robusto e preciso da ação farmacológica de um composto no organismo (UPTON; MOULD, 2014).

Modelos popPK/PD podem ser divididos em modelos empíricos (“*top-down*”) ou modelos mecanísticos (YU; WILSON, 2010). Os modelos empíricos descrevem, por exemplo, a variação de *endpoints* clínicos (ex.: variação de biomarcadores) em função do tempo, baseados no ajuste de uma função matemática aos dados observados, normalmente sem considerar o mecanismo de ação do fármaco. Apesar de serem modelos simples e descritivos, possuem menor poder de previsão do que os modelos mecanísticos (AIT-OU DHIA; MAGER; STRAUBINGER, 2014).

Por outro lado, os modelos mecanísticos descrevem os efeitos clínicos de um fármaco em função do tempo baseados em parâmetros obtidos *in vitro* e também em observações fisiológicas dos indivíduos. Esse tipo de modelo faz uma distinção clara de parâmetros específicos do fármaco (ex.: sítio de ação, afinidade com a proteína alvo, logP, solubilidade) e parâmetros específicos do sistema biológico com o qual o fármaco atua (ex.: densidade de receptores, progressão da doença, feedback homeostático, fluxo sanguíneo) (YU;

WILSON, 2010). Dessa forma, são modelos mais complexos e com uma capacidade de previsão mais robusta, já que é possível relacionar alterações que uma condição fisiopatológica pode causar em parâmetros específicos do sistema com alterações no efeito farmacológico (UPTON; MOULD, 2014).

Modelos PK/PD têm sido utilizados para compreender os processos de distribuição de fármacos no SNC, buscando principalmente caracterizar mecanismos de transporte de fármacos através da BHE. Como exemplo pode-se citar o estudo de Boström e colaboradores (2008) que utilizaram um modelo PK/PD para investigar como as diferenças no transporte através da BHE de oxicodona e morfina influenciam na potência desses dois fármacos em ratos Sprague-Dawley machos. Após os animais atingirem concentrações de *steady state* para morfina ou oxicodona foi utilizada a técnica de microdiálise para determinar as concentrações livres no plasma e no estriado (dados PK) e o efeito antinociceptivo de cada fármaco utilizando o teste de retirada da cauda (*tail-flick test*) da água quente (dados PD). Os dados PK foram utilizados para construção de um modelo farmacocinético populacional que descreve a taxa de transporte de morfina e oxicodona através da BHE ( $CL_{in}$  e  $CL_{out}$ ) e a extensão ( $K_{p,uu}$ ) de distribuição de ambos os fármacos no cérebro. O modelo PK foi então combinado aos dados de PD, descritos por um modelo de efeito linear (efeito = inclinação da linha de base  $\times C_{fármaco}$ ) para obtenção de um modelo PK/PD onde foi possível avaliar as diferenças nos parâmetros farmacodinâmicos da morfina e da oxicodona. A diferença de seis vezes na razão entre a concentração livre cerebral e a concentração livre no plasma ( $K_{p,uu}$ ) prevista pelo modelo para oxicodona e morfina implica que, para a mesma concentração livre no plasma, as concentrações livres cerebrais da oxicodona serão seis vezes maiores que as de morfina, causando o maior efeito observado.

Além da descrição da relação entre os dados de PK e PD, existe um grande potencial de aplicação de modelos PK/PD para investigar mecanismos e simular cenários distintos com o uso de formulações farmacêuticas, especialmente nanotecnológicas. Através da modelagem PK/PD é possível entender o transporte, a captação, o *delivery* a partir da nanopartícula e a disposição de fármacos no plasma e em diferentes tecidos, assim como entender a contribuição dos nanocarreadores na modulação da resposta

terapêutica. Os modelos matemáticos desenvolvidos para formulações nanotecnológicas podem funcionar como uma ferramenta *in silico* para otimização desses nanocarreadores, já que permitem descrever *in vivo* parâmetros formulação dependente (ex.: a taxa de liberação do fármaco do nanocarreador) e compreender como esses parâmetros impactam na modulação da farmacocinética e da farmacodinâmica do fármaco nanoformulado.

Exemplos de modelos farmacocinéticos que descrevem a distribuição e a liberação de nanocarreadores estão descritos na literatura (LINDQVIST et al., 2013; LINDQVIST; FRIDÉN; HAMMARLUND-UDENAES, 2016; YUAN et al., 2019). Lindqvist e colaboradores (2013), por exemplo, desenvolveram uma formulação de lipossomas PEGilados decorados com glutathione (GSH) contendo o peptídeo opioide DAMGO e avaliaram a farmacocinética e a distribuição cerebral através de microdiálise cerebral e plasmática do peptídeo administrado em solução (free-DAMGO) e encapsulado na formulação lipossomal (GSH/PEG-DAMGO). A partir dos perfis de concentração livre-tempo plasmática e cerebrais obtidos foi construído um modelo popPK onde demonstrou-se que o efluxo através da BHE ( $CL_{out}$ ) para free-DAMGO é 10 vezes maior que o influxo ( $CL_{in}$ ) causando assim, uma baixa penetração desse peptídeo no cérebro. Além disso, através de simulações baseadas nos dados experimentais obtidos a partir dos dados de GSH/PEG-DAMGO foi possível explorar o mecanismo que explica a maior exposição cerebral quando o composto é administrado na formulação lipossomal. Simulações de diferentes taxas de liberação de DAMGO do lipossoma permitiram demonstrar que a extensão de distribuição cerebral do composto pode ser regulada e que o mecanismo mais provável de distribuição de GSH/PEG-DAMGO para o cérebro é a fusão do lipossoma com a membrana luminal endotelial. Esse trabalho demonstra que a combinação de dados experimentais, modelagem matemática e simulações é útil para explorar e prever possibilidades e limitações no uso de sistemas nanoestruturados para *delivery* cerebral de fármacos. A limitação desse trabalho, no entanto, é que as formulações foram avaliadas em animais hígidos, sem doenças que poderiam afetar a BHE e alterar a disposição e a capacidade de distribuição dos nanocarreadores.

A modelagem farmacocinética de base fisiológica (PBPK) também tem sido uma ferramenta bastante útil para caracterizar e prever a disposição sistêmica, a exposição tecidual, a eficácia e a toxicidade de formulações contendo nanopartículas. De maneira geral, modelos PBPK assumem que o organismo é constituído de compartimentos que representam fisiologicamente órgãos, tecidos e outros espaços fisiológicos (JONES; ROWLAND-YEO, 2013). Entretanto, as aplicações, vantagens e desvantagens da utilização de modelos PBPK para nanoformulações não fazem parte do escopo desta tese.

Observa-se na literatura um aumento da utilização de estratégias de MM&S para avaliar a eficiência de fármacos em estudos pré-clínicos e clínicos de desordens do SNC tais como depressão, Alzheimer e esquizofrenia (SRINIVAS; MAFFUID; KASHUBA, 2018).

Olsen e colaboradores (2008), em um estudo pré-clínico, obtiveram concentrações plasmáticas totais no *steady state* para o antipsicótico típico haloperidol e para quatro antipsicóticos atípicos: sertindol, clozapina, risperidona e olanzapina (dados de PK), avaliaram a capacidade desses fármacos de suprimir a esquiva condicionada em um teste comportamental e determinaram *in vivo* a ocupação de receptores de dopamina ( $D_2$ ) no estriado (dados PD) de ratos Wistar machos. O conjunto de dados PK e PD obtidos foi utilizado para a construção de um modelo PK/PD clássico (abordagem não populacional) capaz de relacionar a magnitude de ocupação de receptores  $D_2$  necessária para suprimir a esquiva condicionada nos ratos com a concentração plasmática necessária para obter 50% da resposta relativa ao fármaco ( $EC_{50}$ ). Esses resultados foram comparados com valores reportados para ocupação de receptores  $D_2$  e  $EC_{50}$  de pacientes esquizofrênicos responsivos ao tratamento com antipsicóticos. Os autores obtiveram boa correlação entre os níveis plasmáticos eficazes na supressão da resposta de esquiva condicionada em ratos e aqueles terapeuticamente eficazes em pacientes para o haloperidol, clozapina e risperidona, mas o modelo PK/PD previu valores 3 e 4 vezes mais altos para o sertindol e a olanzapina, respectivamente. Assim, o modelo proposto pode atuar como um guia para a determinação de concentrações plasmáticas efetivas de potenciais antipsicóticos no cenário clínico, o que poderia acelerar o processo geral de desenvolvimento de fármacos.

Johnson e colaboradores (2011) desenvolveram um modelo PK/PD populacional híbrido semi-mecânico e baseado na fisiologia capaz de prever o curso temporal da ocupação de receptores de dopamina (D<sub>2</sub>) no estriado de ratos Wistar machos após administração intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea de olanzapina em dose única variando entre 0.01 e 40 mg/kg. Para construção do modelo foram utilizadas concentrações cerebrais totais obtidas por homogeneizado de tecido, concentrações plasmáticas totais além da taxa de ocupação de receptores D<sub>2</sub> obtida *in vivo*. A validade do modelo proposto foi confirmada pela boa concordância entre as constantes e parâmetros estimados pelo modelo e os valores da taxa de dissociação *in vitro* obtidos da literatura. Segundo os autores, a vantagem do modelo desenvolvido é que, uma vez que o mesmo inclui a cinética de ligação aos receptores e a farmacocinética plasmática e cerebral da olanzapina como base para previsão da ocupação de receptores *in vivo*, esta estratégia pode ser utilizada para escalonamento de informações obtidas *in vitro* e no cenário pré-clínico para os cenários clínicos.

Baseados nesse modelo desenvolvido por Johnson e colaboradores, Kozielska e colaboradores (2012) foram capazes de descrever o perfil de concentração plasmático, a exposição cerebral total e a ocupação de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> e serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> dos antipsicóticos atípicos risperidona e paliperidona em ratos. Os autores apontam que foi necessário realizar ajustes no modelo estrutural como a inserção de um parâmetro que considera a formação do metabólito ativo da paliperidona e a adição de um efluxo deste metabólito através da BHE. Simulações realizadas com o modelo proposto demonstraram que o padrão de distribuição cérebro:plasma é um forte influenciador da afinidade do fármaco pelos receptores investigados e, por isso, os autores tiveram que adicionar a afinidade aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> no modelo desenvolvido. Desta forma obtiveram um modelo que também apresenta capacidade translacional de cenários pré-clínicos para clínicos.

Em um estudo clínico com pacientes esquizofrênicos que receberam tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos, Pilla Reddy e colaboradores (2013) caracterizaram a evolução dos escores de três subescalas (positiva, negativa e geral) da escala de síndrome positiva e negativa (PANSS), utilizada para avaliar o grau de esquizofrenia em pacientes. Utilizando um modelo

PK/PD os autores foram capazes de diferenciar o efeito dos antipsicóticos nos diferentes domínios de sintomas da esquizofrenia, revelando, por exemplo, que a olanzapina apresenta um efeito superior no tratamento de sintomas negativos em comparação com outros antipsicóticos não-clozapínicos.

Diante do exposto, esta tese objetivou investigar as alterações de disposição cerebral e de efeito da QTP carregada por nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (QLNC) em um modelo animal de esquizofrenia através do desenvolvimento de um modelo PK/PD, buscando ampliar o entendimento do papel desse tipo de nanocarreador no *delivery* cerebral e no efeito antipsicótico.





## **CAPÍTULO 1**

---



# QUETIAPINE LIPID CORE NANOCAPSULES RESTORE PREPULSE INHIBITION DEFICITS IN A NEURODEVELOPMENTAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA IN MALE AND FEMALE RATS

Carreño F<sup>1\*</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Staudt KJ<sup>1</sup>, Paese K<sup>1</sup>, Meyer FS<sup>2</sup>, Herrmann AP<sup>3</sup>,  
Guterres SS<sup>1</sup>, Rates SMK<sup>1</sup>, Dalla Costa T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>2</sup>Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## ABSTRACT

Lipid core nanocapsules (LNC) has been extensively studied as a new treatment strategy to improve therapeutic effects of antipsychotic drugs. We investigated the efficacy of quetiapine LNCs (QLNCs) on the poly(i:c) model of schizophrenia in both male and female rats using the pre-pulse inhibition of startle response (PPI) test paradigm after evaluating the outcomes of three different poly(i:c) doses administered to pregnant dams at GD15 on neurodevelopmental outcomes of maternal immune activation (MIA) in adult male and female offspring. QTP solution was not capable of producing a reversal in the sensorimotor gating-disruptive effect caused by the prenatal poly(i:c) exposure. The same dose of QTP given as QLNCs significantly improved PPI-impairment. This is the first study reporting the restoration of the PPI deficits in a neurodevelopmental model of SCZ using LNCs. This is a promising delivery system strategy to improve antipsychotic effects contributing to the development of better SCZ pharmacological treatments.

O **capítulo 1**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 67 – 96, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta da investigação da eficácia de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo quetiapina em modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia utilizando o paradigma do teste de inibição de sobressalto por pré-pulso.



## CAPÍTULO 2

---



A VERSATILE LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF  
NEUROTRANSMITTERS IN MICRODIALYSIS SAMPLES APPLIED TO  
INVESTIGATE THE EFFECT OF QUETIAPINE IN SCHIZOPHRENIC-LIKE  
ANIMALS

Carreño F<sup>1</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Staudt KJ<sup>1</sup>, Olivo, LB<sup>1</sup>, Barreto, F<sup>2</sup>, Herrmann, AP<sup>4</sup>,  
Rates SMK<sup>3</sup>, Dalla Costa T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacokinetics and PK/PD Modeling Laboratory, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>2</sup>National Laboratory Network for Agriculture and Livestock - LANAGRO

<sup>3</sup>Experimental Psychopharmacology Laboratory, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul ;

<sup>4</sup>Pharmacology and Therapeutics Graduate Program, Basic Health Science Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**ABSTRACT**

A versatile method was developed and validated for simultaneous determination of the monoamine neurotransmitters (MNT) dopamine (DA), 3-4-dihydroxyphenilacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in rat brain microdialysate samples using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method allowed for small sample volume, using positive and negative ionization mode in a single run analysis without any derivatization or cleanup steps. Analytes were quantified at concentrations ranging from 100 ng/mL to 0.05, 10, 0.5, 0.1 or 1 ng/mL (lower limit of quantification, LLOQ) of DA, DOPAC, HVA, 5-HT and 5-HIAA, respectively, showing linearity ( $r > 0.98$ ), accuracy, and precision (R.S.D  $\pm$  15%) according to validation limits accepted by international guidelines. The method was successfully applied for monitoring the concentration changes of MNT in microdialysate samples from medium prefrontal cortex of Wistar rats in a neurodevelopmental model of schizophrenia before and after quetiapine 5 mg/kg i.v. *bolus* dose administration. No

alterations in MNTs were observed in schizophrenic-like animals in comparison to the baseline shading a light on the limited response rate to antipsychotic drugs observed in chronic schizophrenic patients.

O **capítulo 2**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 97 – 130, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta da validação de um método analítico para determinação simultânea dos neurotransmissores dopamina (DA), ácido 3-4-hidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) em amostras de microdialisado cerebral de rato utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em tandem com espectrometria de massa (CLAE-EM/EM).





## **CAPÍTULO 3**

---

---



SEMI-MECHANISTIC PHARMACOKINETIC MODELING OF LIPID CORE  
NANOCAPSULES: UNDERSTANDING QUETIAPINE PLASMA AND BRAIN  
DISPOSITION IN A NEURODEVELOPMENTAL ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Carreño F<sup>1</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Staudt KJ<sup>1</sup>, Olivo, LB<sup>1</sup>, Paese K<sup>1</sup>, Meyer FS<sup>2</sup>, Herrmann AP<sup>3</sup>,  
Guterres SS<sup>1</sup>, Rates SMK<sup>1</sup>, Trocóniz, IF<sup>4,5</sup>, Dalla Costa T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>4</sup>Pharmacometrics & Systems Pharmacology Research Unit, Department of Pharmaceutical Technology and Chemistry, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra;

<sup>5</sup> IdiSNA, Navarra Institute for Health Research.

## ABSTRACT

This study investigated plasma and brain disposition of quetiapine lipid core nanocapsules (QLNC) in naïve and schizophrenic (SCZ-like) rats and developed a semi-mechanistic model to describe changes in both compartments following administration of drug in solution (FQ) or nanoencapsulated. QLNC (1 mg/mL) presented  $166 \pm 39$  nm, low polydispersity, and high encapsulation ( $93.0 \pm 1.4\%$ ). Model building using experimental data from total and unbound plasma and unbound brain concentrations obtained by microdialysis after administration of single i.v. *bolus* dose of FQ or QLNC to naïve and SCZ-like rats. A two-compartment model was identifiable both in blood and in brain with a bi-directional drug transport across the blood-brain barrier ( $CL_{in}$  and  $CL_{out}$ ). SCZ-like rats significant decrease in brain exposure with FQ (decrease in  $CL_{in}$ ) was reverted by QLNC showing that nanocarriers govern quetiapine tissue distribution. Model simulations allowed exploring the potential of LCN for brain delivery.

O **capítulo 3**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 131 – 174, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta do estudo da disposição

plasmática e cerebral, utilizando microdiálise, de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo quetiapina em modelo animal de esquizofrenia. Um modelo farmacocinético populacional semi-mecanístico (popPK) foi desenvolvido para descrever os dados obtidos no estudo de distribuição cerebral e plasmática. Simulações realizadas com o modelo final permitiram explorar o potencial de *delivery* cerebral do nanocarreador investigado.









# PHARMACOKINETIC/PHARMACODYNAMIC MODELING OF CORTICAL DOPAMINE LEVELS AFTER QUETIAPINE LIPID CORE NANOCAPSULES ADMINISTRATION TO SCHIZOPHRENIA PHENOTYPED RAT

Carreño F<sup>1</sup>, Helfer VE<sup>1</sup>, Staudt KJ<sup>1</sup>, Paese K<sup>1</sup>, Meyer FS<sup>2</sup>, Herrmann AP<sup>3</sup>, Guterres SS<sup>1</sup>, Rates SMK<sup>1</sup>, Trocóniz, IF<sup>4,5</sup>, Dalla Costa T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>2</sup>Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>4</sup>Pharmacometrics & Systems Pharmacology Research Unit, Department of Pharmaceutical Technology and Chemistry, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra;

<sup>5</sup> IdiSNA, Navarra Institute for Health Research.

## ABSTRACT

High variability in schizophrenia (SCZ) pharmacological treatment might be related to a pharmacodynamic component, due to alterations in antipsychotic drugs receptor binding or signal transduction and also be related to a pharmacokinetic component that affects biophase drug concentrations due to changes in penetration through the blood-brain-barrier (BBB) caused by the disease. Quetiapine lipid core nanocapsules have shown the capability of modulate drug delivery to the brain. In the present study, we described concentration-effect relationship after administrations of QTP as a solution or nanoencapsulated in SPR and naïve animals viewing to explore the PK and PD components of variability in SCZ response to treatment. A semi-mechanistic PK model was linked to an indirect response PD model to describe changes in dopamine extracellular concentrations in mPFC measured using intracerebral microdialysis. SCZ status increase  $EC_{50}$  values about 3 times reducing QTP pharmacological sensitivity in SPR in comparison to naïve after the administration of 5 mg/kg of FQ formulation. QLNC formulation was not capable of causes alterations in PD parameters. However, once the nanocarrier was

able to modulate drug delivery to the brain there is an increase in DA levels in mPFC of SPR, highlighting the PK component of variability in SCZ pharmacological treatment. To the best of our knowledge, this is the first study that combine microdialysis and PK/PD modeling in a neurodevelopmental model of SCZ to investigate how a nanocarrier can modulate drug PK and PD contributing to development of new treatment strategies for SCZ.

O **capítulo 4**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 175 – 200, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para submissão em periódico científico. Consta do desenvolvimento de um modelo farmacocinético/farmacodinâmico semi mecanístico capaz de descrever as alterações extracelulares de dopamina, medidos por microdiálise, no córtex pré-frontal em ratos hígdos e com esquizofrenia experimental.

**DISCUSSÃO GERAL**

---



O presente trabalho visou contribuir para o entendimento das alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas relacionadas à nanoencapsulação de quetiapina em um nanocarreador polimérico de núcleo lipídico, permitindo elucidar como esse nanocarreador modula a disposição e o efeito farmacológico do fármaco quando há comprometimento da BHE devido à esquizofrenia experimental em ratos machos e fêmeas. Para atingir essa meta, utilizou-se uma estratégia experimental inovadora que combinou experimentos de microdiálise cerebral, para medida tanto do fármaco como de neurotransmissores, associados à modelagem matemática e simulação.

Doenças do SNC, tais como esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer, depressão, ansiedade e epilepsia acometem milhões de pessoas em todo o mundo e são um grande problema de saúde pública. Apesar dos avanços das pesquisas científicas nas últimas décadas ter acelerado a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e bioquímicos dessas doenças, os progressos relacionados ao tratamento, especialmente novas farmacoterapias, foram mínimos.

Para que um fármaco seja capaz de exercer sua ação no SNC é necessário que o mesmo atravesse a BHE, que regula a penetração cerebral de substâncias nas células do epitélio vascular que compõe a barreira através de transporte paracelular (zônulas de oclusão e alta condutividade do endotélio) e transcelular (expressão de mecanismos de influxo e efluxo). Diferentes fatores podem alterar a passagem de fármacos na BHE, impedindo a manutenção de concentrações cerebrais suficientes para exercer efeito farmacológico desejado.

A utilização de nanocarreadores como nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanopartículas poliméricas tem demonstrado ser uma estratégia promissora para melhorar o *delivery* cerebral de fármacos (CARREÑO et al., 2015, 2016a, 2016b; LINDQVIST et al., 2013; VIEIRA et al., 2016). Trabalhos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em Farmacocinética e Modelagem PK/PD tem buscado compreender as alterações farmacocinéticas relacionadas à nanoencapsulação de fármacos e a interação desses nanocarreadores com as barreiras fisiológicas do SNC.

Carreño e colaboradores (2016a) demonstraram que nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo quetiapina (QLNC) foram capazes de

aumentar a exposição tecidual total ao fármaco, medida em homogeneizado cerebral e hepático de ratos Wistar machos hígdos<sup>1</sup>, porém não foram capazes de alterar as concentrações livres (não ligadas a proteínas) cerebrais em comparação com a QTP administrada em solução (FQ). Após administração de probenecida, inibidor de transporte de influxo, a penetração cerebral da QTP administrada como solução, determinada a partir do fator de penetração, foi reduzida  $1,55 \pm 0,17$  para  $0,94 \pm 0,15$ . Esse resultado comprova que a QTP é substrato para transportadores de influxo presentes na BHE, uma vez que a penetração cerebral do fármaco é maior que a unidade em condição fisiológica, sendo reduzida para valor próximo a um quando o transportador de influxo é inibido. No entanto, a penetração cerebral do fármaco nanoencapsulado não foi alterada ( $0,88 \pm 0,21$  e  $0,92 \pm 0,13$ , respectivamente), evidenciando que a QTP nanoencapsulada é carregada para o parênquima cerebral pela LNC e não está disponível para interagir com transportadores presentes na BHE (CARREÑO et al., 2016b).

Sabe-se da literatura que aproximadamente 60% dos pacientes esquizofrênicos não respondem ao tratamento farmacológico ou apresentam recaídas ao longo do curso da doença (AMATO et al., 2017). Alterações patológicas na BHE são reconhecidas como um fator central para uma série de distúrbios neurológicos (STOLP et al., 2009; VARATHARAJ; GALEA, 2017). Embora haja uma alta variabilidade na resposta crônica ao tratamento da SCZ, a relação entre esquizofrenia, alterações da BHE e falta de resposta farmacológica aos antipsicóticos é pouco explorada na literatura atualmente. Ainda menos investigada é a possível influência do componente farmacocinético na variabilidade da resposta farmacológica aos antipsicóticos nesses pacientes.

Sabe-se, ainda, que a incidência desse distúrbio psíquico é ligeiramente maior em homens do que em mulheres, sendo que as mulheres apresentam sintomas menos severos e melhor prognóstico (LI et al., 2016). Uma das hipóteses para explicar as diferenças entre os sexos observadas no curso e prognóstico da SCZ postula que há uma proteção estrogênica na BHE, uma vez que a expressão de transportadores de influxo e efluxo sofre

---

<sup>1</sup> No presente trabalho, o termo hígdio usado em português corresponde ao termo *naïve* usado nos textos em inglês.

influência reguladora desse hormônio, podendo estar alterada nessas pacientes (MORRIS; LEE; PREDKO, 2003).

Diante desse cenário, os resultados promissores com as QLNC obtidos previamente originaram novos questionamentos: “Existem diferenças na exposição à QTP em diferentes regiões cerebrais, provocadas por diferenças de distribuição das nanocápsulas no parênquima cerebral?; “É possível descrever *in vivo* a liberação da QTP a partir das QLNC?; “De que maneira as QLNC modulam a farmacocinética da QTP se a BHE está alterada, como na esquizofrenia?; “Há diferenças na penetração cerebral das QLNC em machos e fêmeas hípidos e com alterações na BHE, como ocorre na esquizofrenia?; “É possível correlacionar as concentrações cerebrais livres da QTP administrada como FQ e como QLNC com as concentrações cerebrais de neurotransmissores utilizando ferramentas de farmacometria?”

Nesse contexto, a hipótese central explorada nesta tese foi que a resistência à farmacoterapia em pacientes esquizofrênicos poderia estar associada a alterações da BHE que limitam a penetração de antipsicóticos para o parênquima cerebral e que as QLNC seriam capazes de sobrepor essas limitações, controlando o *delivery* cerebral e melhorando a eficácia da QTP nesses pacientes.

Como nos estudos anteriores investigamos a penetração cerebral da QLNC somente em ratos Wistar machos hípidos, tornou-se fundamental avaliar as diferenças de disposição e resposta dos sistemas nanoencapsulados em um modelo animal preditivo e confiável, capaz de mimetizar as alterações cerebrais encontradas na esquizofrenia, como é o modelo de ativação da resposta imune materna por poli(i:c), utilizando para tanto machos e fêmeas.

O desenho experimental desta tese foi, portanto, dividido em quatro etapas: a) etapa de implementação do modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia; b) etapa PK, que teve como objetivo avaliar comparativamente os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e a distribuição da QTP administrada como FQ e como QLNC no hipocampo e córtex pré-frontal em modelo de esquizofrenia em ratos Wistar machos e fêmeas; c) etapa PD, cujo objetivo foi investigar as alterações nos parâmetros farmacodinâmicos promovido pela nanoencapsulação no mesmo modelo experimental. Nas

etapas PK e PD a microdiálise cerebral foi utilizada para coleta de amostras de líquido intersticial para quantificação da QTP e neurotransmissores, respectivamente. A escolha das regiões cerebrais para o estudo foi fundamentada nas hipóteses bioquímicas descritas na literatura para a gênese de sinais e sintomas característicos da esquizofrenia; e d) etapa de farmacometria, na qual, utilizando os dados coletados, foram desenvolvidos modelos semi-mecanísticos popPK e PK/PD, capazes de descrever as alterações na farmacocinética plasmática, na distribuição cerebral e na resposta à quetiapina nanoencapsulada em animais com esquizofrenia experimental.

O modelo de ativação imune pré-natal é induzido em ratas prenhas por injeção intravenosa de ácido poli-inosínico:policitidílico [poli(i:c)], um RNA dupla fita, mimetizando uma infecção viral por ativação de receptores *toll-like* 3 (PATRICH et al., 2016; ZUCKERMAN et al., 2003; ZUCKERMAN; WEINER, 2005). As citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a resposta imune materna são capazes de alterar a neurogênese dos embriões que, na idade adulta, apresentarão alterações anatômicas (afinamento do córtex límbico e aumento da densidade de empacotamento neuronal), déficit comportamental (diminuição da inibição de pré-pulso, perturbação no aprendizado e aumento da resposta a anfetaminas) e alteração da neuroquímica cerebral (hipofunção dopaminérgica no córtex pré-frontal, por exemplo) resultando em um fenótipo neurobiológico e comportamental similar ao da esquizofrenia (PATRICH et al., 2016; PIONTKEWITZ; ARAD; WEINER, 2011).

Uma vez que os mecanismos pelos quais insultos virais durante a neuro-ontogênese podem causar uma patologia latente no SNC ainda não estão completamente elucidados, o sucesso do modelo proposto depende da capacidade da dose de poli(i:c) administrada produzir uma resposta imune materna adequada, consistente e com a liberação de citocinas pró-inflamatórias que irão interferir com o desenvolvimento normal do cérebro fetal (ZUCKERMAN et al., 2003; ZUCKERMAN; WEINER, 2005). Desse modo, foi necessário determinar a dose ótima de poli(i:c) capaz de gerar prole com sinais e sintomas de esquizofrenia na idade adulta nos animais provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica/UFRGS, através do



teste de diferentes doses do composto (P1 - 1 mg/kg; P4 - 4 mg/kg e P8 - 8 mg/kg).

Considerando que o poli(i:c) produz um desbalanço na resposta inflamatória mediado por aumento da expressão das interleucinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, entre elas respectivamente IL-6 e IL-10, uma forma direta de demonstrar o sucesso na ativação imune é evidenciar o aumento dessas interleucinas na circulação sistêmica das ratas prenhas.

A administração intravenosa de poli(i:c) em ratas Wistar prenhas resultou em um aumento significativo dos níveis plasmáticos da citocinas pró-inflamatória IL-6 (4 horas pós-dose) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (8 horas pós-dose) em comparação com as fêmeas prenhas que receberam volume equivalente de solução salina estéril, de forma dose dependente. Além disso, houve também um desequilíbrio significativo na razão entre IL-6/IL-10 na circulação sistêmica das ratas (Capítulo 1). Essas citocinas causam alterações na barreira hematoplacentária e impactam diretamente no desenvolvimento cerebral da prole.

As alterações comportamentais após a exposição pré-natal a diferentes doses de poli(i:c) foram avaliadas quando a prole atingiu a idade adulta (PND70) através dos testes de labirinto em cruz elevado (LCE), inibição de sobressalto por pré-pulso (PPI) e hiperlocomoção induzida por MK-801.

Houve uma redução significativa na distância total percorrida, no tempo gasto e no número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, especialmente em machos descendentes de mães que foram injetadas com as doses de poli(i:c) de 4 e 8 mg/kg, não havendo diferenças entre essas duas doses. Com base nesses achados, postulamos que a exposição pré-natal ao poli(i:c) não foi capaz de provocar nos animais alterações relacionadas à ansiedade nata. A redução na distância total percorrida no aparato pode estar relacionada ao aumento de comportamento tipo repetitivo (*self-grooming*) durante uma situação estressante, apesar desta medida não ter sido avaliada no presente trabalho. Trabalhos publicados na literatura utilizando cepas de camundongos C57 reportaram que após exposição pré-natal ao poli(i:c), camundongos adultos apresentaram aumento de *self-grooming* quando comparados com proles expostas a salina (SCHWARTZER et al., 2013; XUAN; HAMPSON, 2014).

Os resultados obtidos no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 corroboram estudos prévios descritos na literatura de que a ativação da resposta imune materna (MIA) causa na prole atividade hiperlocomotora em resposta ao antagonista do receptor NMDA, MK-801 e a hipofunção deste receptor é uma das hipóteses envolvidas na fisiopatologia da SCZ.

Tanto animais machos quanto fêmeas dos grupos P4 e P8 apresentaram um aumento pronunciado da atividade locomotora após administração de MK-801, embora esse aumento não tenha sido dose-dependente. Além disso, os animais provenientes da menor dose de poli(i:c) investigada (P1- 1 mg/kg) não diferiram dos controles que receberam salina.

Wolff e Bilkey (2008) sugerem, em seu estudo que doses de poli(i:c), que não são capazes de gerar um desbalanço significativo de citocinas na circulação sistêmica das mães não são capazes de causar alterações no desenvolvimento cerebral dos fetos. Nossos resultados concordam com essa hipótese já que os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10 para a dose de 1 mg/kg não foram diferentes daqueles obtidos para as fêmeas prenhas do grupo controle.

Por fim, um dos achados comportamentais mais consistes observados e descritos na literatura após a MIA com poli(i:c) em diferentes períodos gestacionais é o déficit na inibição de sobressalto induzida por pré-pulso. Este paradigma é um fenômeno multimodal e interespecífico que fornece uma medida operacional dos déficits sensoriais e cognitivos observados na SCZ. Corroborando relatos anteriores (BIKOVSKY et al., 2016; HADAR et al., 2015a, 2015b), no presente estudo, a prole de animais P4 e P8 exibiram uma redução do PPI em comparação com animais do grupo salina e P1.

Embora existam evidências na literatura de que a MIA durante períodos críticos do desenvolvimento pré-natal do cérebro cause efeitos em ratos adultos de maneira sexo-específica (REISINGER et al., 2015), o conjunto de achados deste trabalho não corrobora essa hipótese. Fatores como a dose de poli(i:c) utilizada e o tempo de gestação no qual foi feita a administração, entre outros, podem interagir com o sexo e desempenhar um papel significativo na ausência de diferenças observadas no presente estudo.

Com a relevância pré-clínica que o teste de PPI apresenta para a exploração de estratégias terapêuticas farmacológicas para a SCZ,

investigamos os efeitos da nanoencapsulação da QTP na resposta ao PPI em comparação com a QTP administrada em solução utilizando a prole proveniente de ratas prenhas administradas com poli(i:c). A QTP na dose de 5 mg/kg administrada por via intravenosa à prole P4 não foi capaz de produzir uma reversão no déficit de PPI causado pela MIA. Por outro lado, a mesma dose de QLNC resultou em uma melhora significativa do comprometimento dos animais no PPI. A hipótese para explicar esse resultado é de que a QLNC modula a exposição cerebral à QTP. Em estudo prévio, animais que receberam quetiapina nanoencapsulada apresentaram um aumento de cerca de duas vezes na exposição cerebral ao fármaco medida em homogeneizado de tecido (Carreño et al., 2016a). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que relata a restauração dos déficits de PPI em um modelo neurodesenvolvimental de SCZ utilizando antipsicótico nanoencapsulado e demonstram o potencial de aplicação das nanopartículas no tratamento farmacológico da SCZ.

A etapa seguinte da tese foi a avaliação comparativa da farmacocinética plasmática e da distribuição cerebral da QTP, através de microdiálise em duas distintas regiões cerebrais (hipocampo e córtex) de ratos Wistar machos e fêmeas com SCZ experimental após administração intravenosa do fármaco em solução ou nanoencapsulado (Capítulo 3).

O conjunto de dados de concentração plasmática total, concentração hipocampal e cortical livre versus tempo, juntamente com os resultados obtidos em trabalhos anteriores desenvolvidos por Carreño e colaboradores (2015, 2016a, 2016b) foram utilizados para o desenvolvimento de um modelo farmacocinético semi-mecanístico utilizando uma abordagem populacional capaz de descrever as alterações na farmacocinética plasmática e cerebral após a administração de QTP em solução (FQ) ou nanoencapsulada (QLNC) em animais de ambos os sexos hípidos e provenientes do modelo neurodesenvolvimental de SCZ [de agora em diante denominados poli(i:c)] buscando aumentar a compreensão do papel desse nanocarreador na disposição cerebral quando a BHE está comprometida pela doença.

Assim como observado nos resultados dos experimentos comportamentais, a utilização do sexo como covariável no modelo popPK desenvolvido não alterou os parâmetros farmacocinéticos estimados quando animais machos e fêmeas hípidos ou poli(i:c) administrados com a mesma

formulação (FQ ou QLNC) foram comparados dentro do mesmo grupo. Esse resultado indica que o sexo não influencia a farmacocinética plasmática e a penetração cerebral da QTP, mesmo na condição de BHE alterada.

Utilizando o modelo popPK desenvolvido para FQ foi possível simular a exposição plasmática e cerebral livre em animais hígdos e poli(i:c). Não houve alteração significativa nos perfis de concentração plasmática *versus* tempo quando animais hígdos e poli(i:c) foram comparados, demonstrando que a exposição pré-natal a MIA não afeta a disposição e a eliminação plasmática da QTP. No entanto, as concentrações livres cerebrais são as responsáveis pelo efeito terapêutico sendo mais relevantes que as concentrações plasmáticas. Uma redução significativa da exposição cerebral à QTP foi observada nos animais poli(i:c) em relação aos animais hígdos quando o fármaco foi administrado como FQ. Isso pode ser explicado pelo insulto pré-natal desencadeado pela MIA que prejudicou o desenvolvimento cerebral da prole, resultado em alterações de longo prazo na BHE dos animais adultos. Assumindo que as alterações da BHE observadas no modelo poli(i:c) mimetizam o que acontecem em humanos com SCZ, concentrações cerebrais menores de QTP seriam esperadas em pacientes esquizofrênicos que recebem o fármaco não-encapsulado.

Através do modelo semi-mecanístico desenvolvido foi possível entender o mecanismo pelo qual essa alteração na BHE ocorre. Os animais com SCZ experimental apresentam redução no transporte por influxo através da BHE, o que pode ser observado pela redução do parâmetro  $CL_{in}$  de 0,045 L/h/kg para 0,019 L/h/kg (Tabela 1, Capítulo 3) quando comparado aos animais hígdos. Em estudo prévio com probenecida havíamos evidenciado que a QTP é substrato para transportadores de influxo na BHE, havendo uma redução do fator de penetração cerebral de 39,4% quando o inibidor de influxo é utilizado em associação com o fármaco (CARREÑO et al., 2016b). Utilizando o modelo popPK desenvolvido nesta tese foi possível confirmar esse achado, observando-se uma redução de  $CL_{in}$  de 38% nos animais poli(i:c), indicando que a SCZ experimental inibe os transportadores de influxo de modo semelhante ao observado com o inibidor, levando à redução da exposição cerebral à QTP.

Este resultado inédito pode auxiliar no entendimento da resistência ao tratamento farmacológico da SCZ, já que a disposição cerebral de antipsicóticos como a QTP, que penetra no cérebro por difusão e influxo, poderá estar diminuída em pacientes esquizofrênicos. Além disso, esse resultado também corrobora e explica a falta de resposta dos animais poli(i:c) que receberam FQ no teste do PPI. Utilizando o modelo popPK foi possível prever o valor de  $CL_{in}$  individual para cada um dos animais que receberam FQ e correlacioná-los com os resultados do teste de PPI. Os resultados demonstram de maneira inédita que quanto maior o déficit pré-atencional no PPI, maior é o comprometimento do transporte da QTP através da BHE (Figura 3, Capítulo 3). Os resultados, no entanto, não permitem concluir se as alterações causadas no influxo através da BHE no modelo de SCZ são devidas à redução da expressão ou da atividade dos transportadores de influxo presentes na BHE. Para responder a esse questionamento, bem como para demonstrar se há também alteração no transporte por efluxo na BHE devido a SCZ, mais estudos são necessários.

O modelo popPK desenvolvido foi expandido para investigar a modulação da farmacocinética da QTP quando administrada como QLNC tanto em animais hígidos quanto em animais com SCZ experimental.

Normalmente, os estudos de cinética de liberação de fármacos a partir de nanocarreadores são realizados *in vitro* em ensaios de liberação utilizando saco de diálise. A interpretação quantitativa desses ensaios é facilitada pela utilização de modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem ou modelo de Higuchi, que traduzem matematicamente a curva de liberação em parâmetros relacionados com o nanocarreador em estudo, visando estabelecer uma correlação desses com os resultados farmacocinéticos obtidos *in vivo*.

No presente estudo, utilizando a modelagem popPK, fomos capazes de descrever a cinética de liberação da QTP a partir das QLNCs no plasma *in vivo* e propor um mecanismo de distribuição do nanocarreador para cérebro e outros tecidos, bem como de liberação da QTP nanocarreada nos mesmos.

É importante ressaltar que, durante o desenvolvimento da formulação de nanopartículas, a QTP foi escolhida como fármaco modelo levando em consideração as características físico-químicas da molécula, especialmente seu  $\log D$  (2,6), que aumenta a eficiência de encapsulação neste tipo de

nanocarreador e a distribuição do fármaco majoritariamente no núcleo da partícula. A partir da aplicação do algoritmo desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2012), foi possível propor a distribuição da QTP na estrutura das LNCs (CARREÑO et al., 2015), demonstrando que grande parte do fármaco encontra-se disperso no núcleo e na parede polimérica do nanocarreador (~95%) e o restante encontra-se em solução.

Através do modelo popPK desenvolvido foi possível demonstrar que as LNCs liberam a QTP no plasma com duas constantes distintas de primeira ordem:  $K_{relFAST}$  e  $K_{relSLOW}$  (Tabela 1, Capítulo 3). A partir do modelo demonstramos que 8% da dose de QTP administrada sofrerá uma liberação rápida no plasma, pois se encontra nas camadas poliméricas da nanoestrutura ( $F_{external}$ ) e 85% da dose será liberada de maneira mais lenta, pois está dispersa no núcleo lipídico da nanoestrutura ( $F_{core}$ ). Foi possível caracterizar que o  $F_{core}$  terá a capacidade de se distribuir para o cérebro e demais tecidos, liberando o fármaco nesses locais com velocidade distinta daquela determinada em plasma. O restante da dose administrada (~7%) está em solução no momento da administração da formulação, pois não foi nanoencapsulada ( $F_{non-encapsulated}$ ). O conjunto desses resultados corrobora os dados obtidos no estudo prévio de Carreño e colaboradores (2015) e valida o mecanismo proposto de distribuição da QTP no nanocarreador.

Havíamos demonstrado anteriormente que as concentrações totais de QTP, determinadas em homogeneizado de tecido cerebral, estavam aumentadas em animais hígidos administrados com QLNC. No entanto, a exposição cerebral à QTP medida através de microdiálise no líquido extracelular de ratos Wistar machos hígidos era semelhante, independente da formulação administrada (FQ ou QLNC). Através do modelo popPK proposto foi possível explicar esse resultado. A taxa de distribuição da QTP administrada como FQ é similar àquela obtida quando o fármaco é administrado como QLNC ( $CL_{in,naïve} = 0,045$  L/h/kg *versus*  $Q_{nanOTISSUE/BRAIN} = 0,067$  L/h/kg) para os animais hígidos. Entretanto, quando animais com SCZ experimental são administrados com QLNC o transporte do fármaco através da BHE será governado pelo nanocarreador ( $Q_{nanOTISSUE/BRAIN} = 0,067$  L/h/kg), sendo maior do que o transporte do fármaco livre (não ligado às proteínas plasmáticas - 0,019 L/kg/h, Tabela 1, Capítulo 3), já que aproximadamente 85% da dose do

fármaco está nanoencapsulada no núcleo da partícula. Comparando o aumento da exposição cerebral observada em animais com SCZ experimental quando QLNC foi administrado, é possível notar que os nanocarreadores retornaram as concentrações de QTP aos níveis observados em animais hígidos (Figura 6, Capítulo 3).

Os resultados demonstram que a LNC governa a distribuição do fármaco para os tecidos e  $K_{rel_{SLOW}}$  no plasma determina a quantidade de fármaco remanescente no núcleo do nanocarreador, capaz de penetrar no cérebro. As QLNC são compostas por um núcleo lipídico disperso contendo triglicerídeos de cadeia média e monoestearato de sorbitano, envolto por uma parede polimérica [poli ( $\epsilon$ -caprolactona)]. Esse sistema gera uma cinética de liberação do fármaco dependente da viscosidade do núcleo (representada no modelo como  $F_{core}$  e  $K_{rel_{SLOW}}$ ) e a da parede polimérica (representada in vivo por  $F_{external}$  e  $K_{rel_{FAST}}$ ). A taxa de liberação de fármaco dessa nanopartícula ( $K_{rel_{SLOW}}$ ) diminui de acordo com o aumento na concentração do polímero ou na dependência concentrações de triglicerídeos de cadeia média e/ou de monoestearato de sorbitano. Nesse contexto, as simulações realizadas variando em 10 e 100 vezes o valor de  $K_{rel_{SLOW}}$  permitiram entender o impacto desse parâmetro na penetração cerebral da QTP do animais poli(i:c) (Figura 6, Capítulo 3). Foi possível observar que um aumento de 10 vezes no  $K_{rel_{SLOW}}$  aumenta a concentração total no plasma e reduz as concentrações cerebrais livres, no entanto, essas alterações são pequenas e podem não ter um impacto clínico significativo.

As simulações também mostraram que, quanto maior o  $K_{rel_{SLOW}}$ , maior a quantidade de fármaco liberada no plasma e menos eficaz é o nanocarreador para superar as alterações na BHE produzidas nos animais poli(i:c). Apenas um aumento de 100 vezes na liberação do fármaco a partir do núcleo da LNC poderia comprometer a melhora significativa na penetração cerebral da QTP pela QLNC em animais poli(i:c), o que na prática seria impossível de ser obtido, mesmo alterando as proporções dos componentes da formulação.

A quantificação da QTP em amostras de plasma, microdialisado cerebral e também do fármaco associado às nanocápsulas foi realizada através de metodologias previamente validadas e publicadas. Entretanto, para a etapa PD do trabalho era necessário desenvolver e validar

metodologia bioanalítica para a determinação das monoaminas dopamina, serotonina e seus metabólitos em amostras de microdialisado cerebral através de LC-MS/MS.

O método bioanalítico desenvolvido foi validado de acordo com as diretrizes do *Food and Drug Administration* (FDA, 2011) demonstrando-se seletivo, preciso, exato sensível e permitiu o monitoramento *in vivo* das monoaminas (DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA) em amostras de microdialisado de córtex pré-frontal de ratos hígdos e com SCZ experimental. Entre as vantagens do método bioanalítico proposto em relação a outros métodos descritos na literatura destacam-se a minimização do tempo analítico (15 min) e do volume de amostra injetado (20 µL), além da quantificação de analitos em modo de eletrospray positivo e negativo na mesma corrida cromatográfica, sem a necessidade de etapas de derivatização ou extração das amostras (Capítulo 2). O método desenvolvido foi empregado com sucesso para avaliar os níveis basais de monoaminas em animais hígdos e do modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia e também as alterações após a administração das formulações avaliadas nesta tese (FQ e QLNC).

Os animais hígdos administrados com as formulação FQ e QLNC, ambos na dose de 5 mg/kg, apresentaram aumento significativo e semelhante dos níveis extracelulares de DA em relação à linha de base, diferentemente dos animais poli(i:c), que apresentaram alterações significativas equivalentes nos níveis desse neurotransmissor apenas após a administração de QLNC. Não foram observadas diferenças significativas em relação à linha de base de nenhum dos outros compostos (DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA) em nenhum dos grupos investigados.

A integração do modelo popPK desenvolvido (Capítulo 2) com os dados de níveis extracelulares de DA permite explorar os componentes farmacocinético e farmacodinâmico da variabilidade de resposta ao tratamento farmacológico da SCZ, descrevendo a relação concentração-efeito *in vivo* das formulações investigadas.

O modelo popPK/PD desenvolvido permitiu demonstrar, pela primeira vez, que a SCZ experimental reduz a sensibilidade farmacológica à QTP, já



que o valor de  $EC_{50}$  estimado pelo modelo foi cerca de 3 vezes maior para os animais poli(i:c) em relação aos animais hígdos administrados com FQ.

Anteriormente (Capítulo 1) havíamos demonstrado que animais poli(i:c) não respondem à formulação FQ no teste comportamental do PPI. Embora a via neurológica que rege a resposta do PPI e as alterações nos níveis extracelulares de DA no mPFC possam não ser correlacionadas, o conjunto de resultados obtidos permite hipotetizar que alterações em outros receptores de neurotransmissores devido a SCZ podem levar a mudanças na potência de fármacos semelhantes àsquelas observadas para o  $EC_{50}$  da QTP. A reduzida penetração cerebral da QTP somada ao aumento no valor do  $EC_{50}$  ajuda a entender a falta de resposta no PPI e destaca a importância do componente farmacodinâmico na alta variabilidade na resposta ao tratamento farmacológico na SCZ.

A utilização do fármaco nanoencapsulado (QLNC) não causou alterações nos parâmetros farmacodinâmicos da QTP. No entanto, como o nanocarreador modula o *delivery* cerebral da QTP foi observado um aumento nos níveis basais de DA no mPFC dos animais poli(i:c). Este resultado evidencia a importância do componente farmacocinético no tratamento farmacológico da SCZ e indica que a nanotecnologia pode ser usada na busca de tratamentos mais efetivos para a doença.

É importante ressaltar que a extrapolação possível com esse modelo PK/PD é limitada, já que, investigamos uma única dose do fármaco. No entanto, é um ponto de partida para uma nova abordagem de avaliação pré-clínica de antipsicóticos usando modelagem matemática & simulação para correlacionar dados obtidos *in vivo* em modelo animal preditivo de SCZ.

Assim, a presente tese apresenta uma abordagem conceitualmente inovadora na investigação do potencial terapêutico de nanopartículas para *delivery* cerebral: estudo farmacocinético pré-clínico em modelo experimental de doença, com investigação farmacocinética e farmacodinâmica utilizando técnica refinada para medir as concentrações livres do fármaco no local de ação e ferramentas de modelagem matemática & simulação para entender os mecanismos envolvidos na liberação *in vivo* do fármaco a partir do sistema nanoestruturado, sua distribuição tecidual e seu efeito.

As diferenças observadas na disposição farmacocinética cerebral e plasmática do fármaco em solução e nos nanocarreadores em animais hígidos e com esquizofrenia experimental, bem como as alterações nos níveis de DA após uso dessas formulações na situação hígido ou doente, permitiram demonstrar a importância da investigação pré-clínica na condição de doença em que o fármaco será utilizado, indicando que a avaliação de nanocarreadores em animais hígidos pode mascarar o potencial real dessas nanoestruturas para o *delivery* de fármacos.

A investigação das concentrações livres (farmacologicamente ativas) através de microdiálise plasmática e cerebral no local de ação dos antipsicóticos, e não somente as concentrações plasmáticas totais ou as concentrações teciduais totais obtidas em homogeneizado de tecidos, geralmente descritas nos estudos de penetração tecidual de nanopartículas, permitiram entender a função do nanocarreador na penetração do fármaco através da BHE, demonstrando seu papel determinante no transporte do fármaco no organismo.

Apesar das medidas farmacocinéticas de exposição ao fármaco, como área sob a curva de concentração vs tempo (ASC) e concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), geralmente relatadas nos estudos farmacocinéticos com nanopartículas serem relevantes para a aplicação biológica dessas formulações, o refinamento da análise dos dados farmacocinéticos utilizando ferramentas de MM&S utilizando neste trabalho permitiu o entendimento dos mecanismos envolvidos no *delivery* cerebral do fármaco em condição de doença, contribuindo para a construção de modelo popPK semi-mecanístico que pode ser utilizado no desenvolvimento de nanocarreadores customizados.

Por fim, diferentemente dos trabalhos tradicionais com nanopartículas, onde são avaliadas de modo independente as alterações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas produzidas pelos nanocarreadores, no presente trabalho, através do uso de modelagem PK/PD, foi possível explorar o potencial terapêutico das nanopartículas, possibilitando a compreensão global do papel dessas LNCs no *delivery* cerebral da quetiapina.

**CONCLUSÕES**

---



O conjunto de resultados desse trabalho permite concluir que o modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia em ratos Wistar machos e fêmeas, através da ativação da resposta imune materna induzida por poli(i:c), foi capaz de causar alterações comportamentais na prole e alterar o padrão de penetração cerebral da QTP, dando suporte a hipótese de que há um componente farmacocinético na variabilidade da resposta terapêutica observada no tratamento farmacológico da esquizofrenia.

A administração da QTP em uma nanopartícula polimérica de núcleo lipídico demonstrou ser capaz de governar a distribuição cerebral do fármaco, superando as alterações causadas pela SCZ experimental e retornando a exposição cerebral da QTP para os níveis observados em animais hípidos.

O desenvolvimento de um modelo farmacocinético semi-mecanístico através de uma abordagem populacional, que descreveu a farmacocinética plasmática e cerebral da QTP em animais hípidos e com SCZ experimental, representou uma estratégia inédita e permitiu entender o mecanismo pelo qual o nanocarreador modula o *delivery* cerebral do fármaco e evidenciar as vantagens de sua aplicação no tratamento da SCZ.

Utilizando a técnica de microdiálise cerebral foi possível medir os níveis intersticiais corticais de dopamina, serotonina e seus metabólitos e demonstrar que, na dose investigada (5 mg/kg), a FQ foi capaz de promover uma alteração nos níveis extracelulares de dopamina em animais hípidos, mas não foi capaz de alterar os níveis intersticiais de dopamina animais com SCZ experimental. Entretanto, quando os animais com SCZ experimental foram administrados com QLNC os níveis intersticiais de dopamina foram semelhantes aos encontrados em animais hípidos.

Através do modelo semi-mecanístico popPK/PD desenvolvido foi possível demonstrar a importância do componente farmacodinâmico na alta variabilidade de resposta farmacológica da SCZ e que as nanopartículas, apesar de não serem capazes de alterar os parâmetros PD da quetiapina, causam um aumento nos níveis basais de dopamina no mPFC dos animais poli(i:c) porque melhoram o *delivery* cerebral do fármaco.

Assim, o conjunto de dados desta tese é inovador e pode contribuir não apenas para uma melhor compreensão do componente farmacocinético

associado à variabilidade na resposta terapêutica da SCZ como também propõe uma estratégia de base nanotecnológica para resolvê-lo.

**REFERÊNCIAS GERAIS**

---





- ABEL, K. M.; DRAKE, R.; GOLDSTEIN, J. M. Sex differences in schizophrenia. **International Review of Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 417–428, 2010.
- ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A. K.; DOLMAN, D. E. M.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease, Special Issue: Blood Brain Barrier**. v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.
- AIT-OU DHIA, S.; MAGER, D.E.; STRAUBINGER, R. M. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 137–74, 2014.
- ALTAMURA, A. C. et al. Neurodevelopment and inflammatory patterns in schizophrenia in relation to pathophysiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 63–70, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2014). Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5.ed.: DSM-5 (Artmed Editora)
- ANTONIO, C. B. et al. LASSBio-579, a prototype antipsychotic drug, and clozapine are effective in novel object recognition task, a recognition memory model. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 339–349, 2016.
- ARSENAULT, D. et al. The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, , v. 38, p. 77–90, 2014.
- ALLARDYCE, J. et al. Association Between Schizophrenia-Related Polygenic Liability and the Occurrence and Level of Mood-Incongruent Psychotic Symptoms in Bipolar Disorder. **JAMA Psychiatry**, 75, p. 28-35, 2018.
- BATINIĆ, B. et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 299, p. 72–80, 2016.
- BALE, T.L., EPPERSON, C.N. Sex differences and stress across the lifespan. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 1413-1420, 2015.
- BARBOUR, A. SCAGLIONE, F., DERENDORF, H. Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 431-438, 2010.
- BARRETTO, E.M.; KAYO, M.; AVRICHIR, B.S.; SA, A.R.; CAMARGO, M.D.; NAPOLITANO, I.C.; NERY, F.G.; PINTO, J.A. JR.; BANNWART, S.; SCEMES S.; DI SARNO, E.; ELKIS H. A preliminary controlled trial of cognitive behavioral therapy in clozapine-resistant schizophrenia. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 197, n. 11, p. 865 -868, 2009.
- BECHTER, K. et al. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: identification of subgroups with immune responses and blood-CSF barrier dysfunction. **Journal of psychiatric research**, v. 44, n. 5, p. 321–30, 2010.
- BELL, J. S. et al. The cortical blood–brain barrier in multiple sclerosis: a gateway to progression? **Journal of Neurology**, 2018.

- BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 1, p. 9, 2011.
- BERNSTEIN, H.-G. et al. Morphometric analysis of the cerebral expression of ATP-binding cassette transporter protein ABCB1 in chronic schizophrenia: Circumscribed deficits in the habenula. **Schizophrenia research**, v. 177, n. 1–3, p. 52–58, 2016.
- BITANIHIRWE, B. K. et al. Late Prenatal Immune Activation in Mice Leads to Behavioral and Neurochemical Abnormalities Relevant to the Negative Symptoms of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2462–2478, 2010.
- BOGART, L. J.; O'DONNELL, P. Multiple long-range inputs evoke NMDA currents in prefrontal cortex fast-spiking interneurons. **Neuropsychopharmacology**, p. 1, 2018.
- BOLKAN, S. S.; CARVALHO POYRAZ, F.; KELLENDONK, C. Using human brain imaging studies as a guide toward animal models of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 321, p. 77–98, 2016.
- BOSTRÖM, E.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; SIMONSSON, U. S. H. Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine. **Anesthesiology**, v. 108, p. 495-505, 2008.
- BRADY, A. M. The Neonatal Ventral Hippocampal Lesion (NVHL) Rodent Model of Schizophrenia. In: **Current Protocols in Neuroscience**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. v. 77p. 9.55.1-9.55.17.
- BRISCH, R. et al. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 47, 2014.
- BROWN, A. S. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 10, p. 1272–1276, 2012.
- BROWN, A. S.; DERKITS, E. J. Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 3, p. 261–280, 2010.
- BUCKLEY, P. F. Neuroimaging of schizophrenia: structural abnormalities and pathophysiological implications. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 1, n. 3, p. 193–204, 2005.
- BUHUSI, M. et al. Chronic mild stress impairs latent inhibition and induces region-specific neural activation in CHL1-deficient mice, a mouse model of schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 1–8, 2017.
- CALZAVARA, M. B. et al. Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 15–22, 2011.
- CARREÑO, F.; PAESE, K.; SILVA, C. M.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T.; Characterizing the mechanism of quetiapine distribution in lipid-core nanocapsules pseudo-phases using a validated LC/UV method. **Quimica Nova**, v. 38, p., 1181–1186, 2015.

- CARREÑO, F. et al. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 152–158, 2016. a.
- CARREÑO, F. et al. Pharmacokinetic Investigation of Quetiapine Transport across Blood–Brain Barrier Mediated by Lipid Core Nanocapsules Using Brain Microdialysis in Rats. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 1289–1297, 2016. b.
- COBA, M. P. et al. Dlgap1 knockout mice exhibit alterations of the postsynaptic density and selective reductions in sociability. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2281, 2018.
- CORRADI, R. B. Schizophrenia as a Human Process. **The Journal of the American Academy of Psychoanalysis and Dynamic Psychiatry**, v. 39, n. 4, p. 717–736, 2011.
- CRUM, W. R. et al. Evolution of structural abnormalities in the rat brain following in utero exposure to maternal immune activation: A longitudinal in vivo MRI study. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 63, p. 50–59, 2017.
- DANHOF, M.; DE LANGE, E. C. M.; PASQUA, O. E. DELLA; PLOEGER, B. A.; VOSKUYL, R. A. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling in translational drug research. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.29, n. 4, p.186–191, 2008.
- DARVESH, A.S.; CARROLL, R.T.; GELDENHUYS, W.J.; GUDELSKY, G.A.; KLEIN, J.; MESHUL, C.K.; VAN DER SCHYF, C.J. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.6, p. 109-127, 2011.
- DE KLERK, O. L. et al. Regional increase in P-glycoprotein function in the blood-brain barrier of patients with chronic schizophrenia: a PET study with [(11)C]verapamil as a probe for P-glycoprotein function. **Psychiatry research**, v. 183, n. 2, p. 151–6, 2010.
- DE SOUZA, D. F. et al. Changes in Astroglial Markers in a Maternal Immune Activation Model of Schizophrenia in Wistar Rats are Dependent on Sex. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 489, 2015.
- DEBNATH, M.; VENKATASUBRAMANIAN, G.; BERK, M. Fetal programming of schizophrenia: Select mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 49, p. 90–104, 2015.
- DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation improves relative bioavailability and antipsychotic effect of olanzapine in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1482–1493, 2014.
- DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation Improves Relative Bioavailability and Antipsychotic Effect of Olanzapine in Rats. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1482–93, 2015.
- DODELL-FEDER, D.; TULLY, L. M.; HOOKER, C. I. Social impairment in schizophrenia: new approaches for treating a persistent problem. **Current opinion in psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 236–42, 2015.
- DONEGAN, J. J.; BOLEY, A. M.; LODGE, D. J. Embryonic stem cell transplants

as a therapeutic strategy in a rodent model of autism. **Neuropsychopharmacology**, 2018.

ENDRES, D. et al. Immunological findings in psychotic syndromes: a tertiary care hospital's CSF sample of 180 patients. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 9, p. 476, 2015.

FATEMI, S.H.; EARLE, J.; KANODIA, R.; KIST, D.; EMAMIAN, E.S.; PATTERSON, P.H.; SHI, L.; SIDWELL, R. Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22 n.1, p. 25-33, 2002.

FATEMI, S. H. et al. The effects of prenatal H1N1 infection at E16 on FMRP, glutamate, GABA, and reelin signaling systems in developing murine cerebellum. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 5, p. 1110–1122, 2017.

FIEL, L.A.; CONTRI, R.V.; BICA, J.F.; FIGUEIRÓ, F.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid- core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 233, 2014.

FINEBERG, A. M.; ELLMAN, L. M. Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 10, p. 951–66, 2013.

FLORES, G.; MORALES-MEDINA, J. C.; DIAZ, A. Neuronal and brain morphological changes in animal models of schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 190–203, 2016.

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: . Acesso em dezembro 2014.

FOND, G.; MACGREGOR, A.; MIOT, S. Nanopsychiatry-The potential role of nanotechnologies in the future of psychiatry: A systematic review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 9, p. 1067–1071, 2013.

FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1472–1481, 2015.

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

GARBETT, K. A. et al. Effects of maternal immune activation on gene expression patterns in the fetal brain. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 4, p. e98–e98, 2012.

- GEYER, M. A. The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? **Neurotoxicity research**, v. 10, n. 3–4, p. 211–20, 2006.
- GILLESPIE, A. L. et al. Is treatment-resistant schizophrenia categorically distinct from treatment-responsive schizophrenia? a systematic review. **BMC Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.
- GOGOS, A. et al. **A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings**, 2015.
- HADAR, R. et al. Using a maternal immune stimulation model of schizophrenia to study behavioral and neurobiological alterations over the developmental course. **Schizophrenia Research**, v. 166, n. 1–3, p. 238–247, 2015. a.
- HADAR, R. et al. Using a maternal immune stimulation model of schizophrenia to study behavioral and neurobiological alterations over the developmental course. **Schizophrenia research**, v. 166, n. 1–3, p. 238–47, 2015. b.
- HARRIS, L. W. et al. The Cerebral Microvasculature in Schizophrenia: A Laser Capture Microdissection Study. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. e3964, 2008.
- HENRIKSEN, M.G., NORDGAARD, J., JANSSON, L.B. Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. **Frontiers in human neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 311:322, 2017
- HERRMANN, A. P. et al. N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. **Schizophrenia Research**, v. 155, n. 1–3, p. 109–111, 2014.
- HERRMANN, A. P. et al. Effects of N-acetylcysteine on amphetamine-induced sensitization in mice. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n. 0, p. 0–0, 2017.
- HILL, R. A. Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 67, p. 41–56, 2016.
- HUBER, T. J. et al. Psychotic disorders and gonadal function: evidence supporting the oestrogen hypothesis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 109, n. 4, p. 269–274, 2004.
- HURTADO, F. K. et al. Population pharmacokinetic modeling of the unbound levofloxacin concentrations in rat plasma and prostate tissue measured by microdialysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 678–686, 2014.
- JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130–140, 2009.
- JOHNSON, M.; KOZIELSKA, M.; PILLA REDDY, V.; VERMEULEN, A.; BARTON, H. A.; GRIMWOOD, S.; DE GREEF, R.; GROOTHUIS, G. M. M.; DANHOF, M.; PROOST, J. H. Dopamine D2 receptor occupancy as a predictor of catalepsy in rats: a pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling approach. **Pharmaceutical Research**, v.31, n. 10, p. 2605–2617, 2014.

JOHNSON, M.; KOZIELSKA, M.; REDDY, V. P.; VERMEULEN, A.; LI, C.; GRIMWOOD, S.; GREEF, R. de; GROOTHUIS, G. M. M.; DANHOF, M.; PROOST, J. H. Mechanism-based pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of the dopamine D2 receptor occupancy of olanzapine in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 10, p. 2490–2504, 2011.

JONES, H. M.; ROWLAND-YEO, K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 14, p. 10-12, 2013.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6646–6655, 2012.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 187, 2010.

JONES, C. A.; WATSON, D. J. G.; FONE, K. C. F. Animal models of schizophrenia. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1162–94, 2011.

JUNG, W. H. et al. Structural Brain Alterations in Individuals at Ultra-high Risk for Psychosis: A Review of Magnetic Resonance Imaging Studies and Future Directions. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 12, p. 1700, 2010.

KAHN, R. S.; SOMMER, I. E. The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 84–97, 2015.

KOZIELSKA, M.; JOHNSON, M.; PILLA REDDY, V.; VERMEULEN, A.; LI, C.; GRIMWOOD, S.; DE GREEF, R.; GROOTHUIS, G. M. M.; DANHOF, M.; PROOST, J. H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the D2 and 5-HT2A receptor occupancy of risperidone and paliperidone in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 7, p. 1932–1948, 2012.

KHANDAKER, G. M. et al. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 2, p. 239–257, 2013.

KHANDAKER, G. M. et al. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. **The Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. 258–270, 2015.

KILIÇASLAN, E. E. et al. Şizofreni Başlangıç Yaşı ile Menarş Yaşı Arasındaki İlişki. **Nöro Psikiyatri Arşivi**, v. 51, n. 3, p. 211–215, 2014.

KRAUSE, M. et al. Antipsychotic drugs for patients with schizophrenia and predominant or prominent negative symptoms: a systematic review and meta-analysis. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 0, n. 123456789, p. 0, 2018.

LAI, C.Y., SCARR, E., UDAWELA, M., EVERALL, I., CHEN, W.J., DEAN, B. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics. **World Journal of Psychiatry**, v. 22, p. 102-117, 2016.

LANDREAU, F. et al. Effects of Two Commonly Found Strains of Influenza A Virus on Developing Dopaminergic Neurons, in Relation to the Pathophysiology

of Schizophrenia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51068, 2012.

LAPPIN, J.M., WIJAYA, M., WATKINS, A., MORELL, R., TEASDALE, S., LEDERMAN, O., ROSENBAUM, S., DICK, S., WARD, P., CURTIS, J. Cardio-metabolic risk and its management in a cohort of clozapine-treated outpatients. **Schizophrenia Research**, v. 199, p. 367-373, 2018.

LAZAR, N. L.; NEUFELD, R. W. J.; CAIN, D. P. Contribution of nonprimate animal models in understanding the etiology of schizophrenia. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 36, n. 4, p. E5-29, 2011.

LEE, J. H. et al. Impaired social behaviors and minimized oxytocin signaling of the adult mice deficient in the N -methyl- d -aspartate receptor GluN3A subunit. **Experimental Neurology**, v. 305, p. 1–12, 2018.

LI, Q. et al. Prenatal Immune Challenge Is an Environmental Risk Factor for Brain and Behavior Change Relevant to Schizophrenia: Evidence from MRI in a Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6354, 2009.

LINDQVIST, A.; RIP, J.; GAILLARD, P. J.; BJÖRKMAN, S.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Enhanced brain delivery of the opioid peptide damgo in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 5, p. 1533–1541, 2013.

LINDQVIST, A.; FRIDÉN, M.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Pharmacokinetic considerations of nanodelivery to the brain: Using modeling and simulations to predict the outcome of liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 173-182, 2016.

LIPSKA, B. K.; WEINBERGER, D. R. To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 223–239, 2000.

LODGE, D. J. The MAM rodent model of schizophrenia. **Current protocols in neuroscience**, v. Chapter 9, p. Unit9.43, 2013.

LÖSCHER, W.; POTSCSKA, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. **Nature Reviews, Neuroscience**, v. 6, n.8, p. 591-602, 2005.

LOW, N. C.; HARDY, J. What Is a Schizophrenic Mouse? **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 348–349, 2007.

MARCOTTE, E. R.; PEARSON, D. M.; SRIVASTAVA, L. K. Animal models of schizophrenia: a critical review. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 26, n. 5, p. 395–410, 2001.

MARKHAM, J. A. Sex steroids and schizophrenia. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 3, p. 187–207, 2012.

MATTEI, D.; SCHWEIBOLD, R.; WOLF, S.A. Brain in flames - animal models of psychosis: utility and limitations. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p. 1313-1319, 2015.

MATSUMOTO, M.; SEYA, T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 7, p.

805–812, 2008.

MAVRIKAKI, M.; NOMIKOS, G. G.; PANAGIS, G. Efficacy of the atypical antipsychotic aripiprazole in d-amphetamine-based preclinical models of mania. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 541, 2010.

RIGGS, M.M.; CREMERS, S. Pharmacometrics and systems pharmacology for metabolic bone diseases. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 85, p. 1049 – 1051, 2019.

MCGREGOR, C.; RIORDAN, A.; THORNTON, J. Estrogens and the cognitive symptoms of schizophrenia: Possible neuroprotective mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 47, p. 19–33, 2017.

MELCANGI, R. C.; PANZICA, G.; GARCIA-SEGURA, L. M. Neuroactive steroids: focus on human brain. **Neuroscience**, v. 191, p. 1–5, 2011.

MEYER, U. et al. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 6, p. 913–947, 2005.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308–1321, 2012.

MEYER, U.; FELDON, J.; YEE, B. K. A Review of the Fetal Brain Cytokine Imbalance Hypothesis of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 5, p. 959–972, 2009.

MILLAN, M. J. et al. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p. 485, 2016.

MILLAR, J.; BILKEY, D. K.; WARD, R. D. Maternal immune activation alters sensitivity to action-outcome contingency in adult rat offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 63, p. 81–87, 2017.

MISIAK, B. et al. Testosterone, DHEA and DHEA-S in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 89, p. 92–102, 2018.

MÖLLER, M.; SWANEPOEL, T.; HARVEY, B. H. Neurodevelopmental Animal Models Reveal the Convergent Role of Neurotransmitter Systems, Inflammation, and Oxidative Stress as Biomarkers of Schizophrenia: Implications for Novel Drug Development. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 987–1016, 2015.

MOONS, T. et al. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 8, p. 1193–1211, 2011.

MORRIS, M.E., LEE, H.J., PREDKO, L.M. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. **Pharmacological Reviews**, v.55, n.22, p. 229-240, 2003.

MOULD, D.R.; UPTON, R.N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 1, n. 9, p. 1-16, 2012.



MOULD, D.R.; UPTON, R.N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 2, p. 1-16, 2013.

MOULD, D.R.; UPTON, R.N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 3: Introduction to Pharmacodynamic Modeling Methods. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 3, p. 1-18, 2014.

NAKAO, K. et al. Schizophrenia-Like Dopamine Release Abnormalities in a Mouse Model of NMDA Receptor Hypofunction. **Schizophrenia Bulletin**, 2018.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–9, 2010.

NEVES, G. et al. Is Forced Swimming Immobility a Good Endpoint for Modeling Negative Symptoms of Schizophrenia? - Study of Sub-Anesthetic Ketamine Repeated Administration Effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1655–1669, 2017.

NIELSEN, P. R.; BENROS, M. E.; MORTENSEN, P. B. Hospital Contacts With Infection and Risk of Schizophrenia: A Population-Based Cohort Study With Linkage of Danish National Registers. **Schizophrenia Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 1526–1532, 2014.

NIELSEN, P. R.; LAURSEN, T. M.; AGERBO, E. Comorbidity of schizophrenia and infection: a population-based cohort study. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 51, n. 12, p. 1581–1589, 2016.

OCHOA, S. et al. Gender Differences in Schizophrenia and First-Episode Psychosis: A Comprehensive Literature Review. **Schizophrenia Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMAN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulation. **Soft Matter**, v.9, p. 1141-1150, 2012.

OKAZAKI, H. et al. Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines. **Neuroscience Letters**, v. 671, p. 99–102, 2018.

OZAWA, K. et al. Immune Activation During Pregnancy in Mice Leads to Dopaminergic Hyperfunction and Cognitive Impairment in the Offspring: A Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 6, p. 546–554, 2006.

PATEL, S.; CHAVHAN, S.; SONI, H.; BABBAR, A.K.; MATHUR, R.; MISHRA, A.K.; SAWANT, K. Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route. **Journal of Drug Targeting**, v.19, n. 6, p. 468-474, 2011.

PATRICH, E. et al. Maternal immune activation produces neonatal excitability defects in offspring hippocampal neurons from pregnant rats treated with poly I:C. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19106, 2016.

PEREIRA, L.; BUDOVICH, A.; CLAUDIO-SAEZ, M. Monitoring of Metabolic Adverse Effects Associated With Atypical Antipsychotics Use in an Outpatient

- Psychiatric Clinic. **Journal of Pharmacy Practice**, p. 89719001775271, 2018.
- PILLA REDDY, V. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antipsychotic drugs in patients with schizophrenia: part II: the use of subscales of the PANSS score. **Schizophrenia research**, v. 146, p. 144-152, 2013.
- PIONTKEWITZ, Y.; ARAD, M.; WEINER, I. Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 1257–1269, 2011.
- POLLAK, T. A. et al. The blood-brain barrier in psychosis. **The lancet. Psychiatry**, v. 5, n. 1, p. 79–92, 2018.
- 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 Letter**, v. 26, p. 173-176, 2002.
- PRYTKOVA, I.; BRENNAND, K. J. Prospects for Modeling Abnormal Neuronal Function in Schizophrenia Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 360, 2017.
- RAPOPORT, J.; GIEDD, J.; GOGTAY, N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1228–1238, 2012.
- REISINGER, S. et al. **The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery**, 2015. a.
- REISINGER, S. et al. The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p. 213–226, 2015. b.
- RÉUS, G. Z. et al. Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. **Neuroscience**, v. 353, p. 17–25, 2017.
- ROENKER, N. L. et al. Effect of paliperidone and risperidone on extracellular glutamate in the prefrontal cortex of rats exposed to prenatal immune activation or MK-801. **Neuroscience letters**, v. 500, n. 3, p. 167–71, 2011.
- ROSE, D. R. et al. Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 63, p. 60–70, 2017.
- RUBIN, L. H. et al. Peripheral oxytocin is associated with reduced symptom severity in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 124, n. 1–3, p. 13–21, 2010.
- RUBIO, M. D.; DRUMMOND, J. B.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Glutamate receptor abnormalities in schizophrenia: implications for innovative treatments. **Biomolecules & therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 1–18, 2012.
- SAHIN, C.; DOOSTDAR, N.; NEILL, J. C. Towards the development of improved tests for negative symptoms of schizophrenia in a validated animal model. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 93–101, 2016.
- SANTOS-TOSCANO, R. et al. Unaltered cocaine self-administration in the

- prenatal LPS rat model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 69, p. 38–48, 2016.
- SATTERTHWAITE, T. D. et al. Structural Brain Abnormalities in Youth With Psychosis Spectrum Symptoms. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 5, p. 515, 2016.
- SHILLIAM, C.S.; DAWSON, L.A. The effect of clozapine on extracellular dopamine levels in the shell subregion of the rat nucleus accumbens is reversed following chronic administration: comparison with a selective 5-HT(2C) receptor antagonist. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 372-380, 2005.
- SILVA, R., ALBUQUERQUE, S., MUNIZ, A.V., FILHO, P., RIBEIRO, S., PINHEIRO, P. R., ALBUQUERQUE, V. Reducing the Schizophrenia Stigma: A New Approach Based on Augmented Reality. **Computational intelligence and neuroscience**, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- SIMPSON, E. H.; KELLENDONK, C. Insights About Striatal Circuit Function and Schizophrenia From a Mouse Model of Dopamine D2Receptor Upregulation. **Biological psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 21–30, 2017.
- SRINIVAS, N., MAFFUID, K., KASHUBA A.D.M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs in the Central Nervous System. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, p. 1059-1074, 2018.
- SUN, J. et al. Progesterone: The neglected hormone in schizophrenia? A focus on progesterone-dopamine interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 74, p. 126–140, 2016. a.
- SUZUKI, T. REMINGTON, G., MULSANT, BH., RAJJI, T.K., UCHIDA, H., GRAFF-GUERRERO, A., MAMO, D.C. Treatment resistant schizophrenia and response to antipsychotics: a review. **Schizophrenia Research**, v. 133, p. 54-62, 2011.
- SWANEPOEL, T.; MÖLLER, M.; HARVEY, B. H. N-acetyl cysteine reverses bio-behavioural changes induced by prenatal inflammation, adolescent methamphetamine exposure and combined challenges. **Psychopharmacology**, p. 1–18, 2017.
- TENREIRO, M. M. et al. Cellular response of the blood-brain barrier to injury: Potential biomarkers and therapeutic targets for brain regeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 91, p. 262–273, 2016.
- URBAN, A.; CUBAŁA, W. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics. **Psychiatria Polska**, v. 51, n. 6, p. 1059–1077, 2017.
- VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. Blood–brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 38, p. 26–34, 2015.
- VENTURINI, C.G., JÄGER, E., OLIVEIRA, C.P., BERNARDI, A., BATTASTINI, A.M.O., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.
- VIEIRA, S. M. et al. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 748–756, 2016.

- VOLPE, F. M. et al. Current inpatient prescription practices for the treatment of schizophrenia in public hospitals of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 39, n. 2, p. 190–192, 2017.
- VOSTRIKOV, V.; ORLOVSKAYA, D.; URANOVA, N. Deficit of pericapillary oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 34–42, 2008.
- WEBER-STADLBAUER, U. Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. e1113, 2017.
- WEBSTER, M. J. et al. Immunohistochemical Localization of Phosphorylated Glial Fibrillary Acidic Protein in the Prefrontal Cortex and Hippocampus from Patients with Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 15, n. 4, p. 388–400, 2001.
- WILSON, C.; TERRY, A. Neurodevelopmental Animal Models of Schizophrenia: Role in Novel Drug Discovery and Development. **Clinical Schizophrenia & Related Psychoses**, v. 4, n. 2, p. 124–137, 2010.
- WINTER, C. et al. Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 513, 2009.
- WOLKING, S. et al. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 7, p. 709–735, 2015.
- XIA, Y. et al. Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 42, p. 212–221, 2014.
- YAMAMURA, S.; OHOYAMA, K.; HAMAGUCHI, T.; KASHIMOTO, K.; NAKAGAWA, M.; KANEHARA, S.; SUZUKI, D.; MATSUMOTO, T.; MOTOMURA, E.; SHIROYAMA, T.; OKADA, M. Effects of quetiapine on monoamine, GABA, and glutamate release in rat prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 206, n. 2, p. 243 – 258, 2009.
- YASIR, M.; SARA, U.V. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: in vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 6, p. 454-463, 2014.
- YEE, N. et al. Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: No evidence for the “double-hit hypothesis”. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 1, p. 180–188, 2011.
- YU, X.Q.; WILSON, A.G.E. The role of pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug discovery and development. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 923-928, 2010.
- ZAVITSANOU, K. et al. Effect of maternal immune activation on the kynurenine pathway in preadolescent rat offspring and on MK801-induced hyperlocomotion in adulthood: Amelioration by COX-2 inhibition. **Brain, Behavior, and**

**Immunity**, v. 41, p. 173–181, 2014.

ZESTOS, A.G.; KENNEDY, R.T. Microdialysis Coupled with LC-MS/MS for In Vivo Neurochemical Monitoring. **The AAPS Journal**, v. 19, p. 1284-1293, 2017.

ZHANG, S. et al. Autophagy- and MMP-2/9-mediated Reduction and Redistribution of ZO-1 Contribute to Hyperglycemia-increased Blood–Brain Barrier Permeability During Early Reperfusion in Stroke. **Neuroscience**, v. 377, p. 126–137, 2018.

ZIMMERMANN, E.S., LAUREANO, J.V., DOS SANTOS, C.N., SCHMIDT, S., LAGISHETTY, C.V., DE CASTRO, W.V., DALLA COSTA, T. Simultaneous Semi mechanistic Population Analyses of Levofloxacin in Plasma, Lung, and Prostate To Describe the Influence of Efflux Transporters on Drug Distribution following Intravenous and Intratracheal Administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, p. 946-954, 2015.

ZUCKERMAN, L. et al. Immune Activation During Pregnancy in Rats Leads to a PostPubertal Emergence of Disrupted Latent Inhibition, Dopaminergic Hyperfunction and Altered Limbic Morphology in the Offspring: A Novel Neurodevelopmental Model of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 10, p. 1778–1789, 2003.

ZUCKERMAN, L.; WEINER, I. Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. **Journal of psychiatric research**, v. 39, n. 3, p. 311–23, 2005.









## Anexo I

Carta de aprovação do projeto no comitê de ética no uso de animais (CEUA/UFRGS)



**U F R G S**  
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:** 31001

**Título:** Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) da Quetiapina Nanoencapsulada em Modelo Animal de Esquizofrenia

**Vigência:** 11/04/2016 à 31/08/2019

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 11/04/2016  
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - pesquisador desde 11/04/2016  
STELA MARIS KUZE RATES - pesquisador desde 11/04/2016  
Fabiola Schons Meyer - pesquisador desde 11/04/2016  
Fernando Olinto Carreño - Aluno de Doutorado desde 11/04/2016

**Equipe Externa:**

Ana Pula Hermann - pesquisador desde 11/04/2016

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 119 ratos Wistar de 90 dias de idade, 20 machos e 99 fêmeas, 176 ratos Wistar machos provenientes do cruzamento dos referidos animais e o descarte de 176 fêmeas recém-nascidas destes mesmos cruzamentos, todos provenientes do CREAL-UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 6 de Maio de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

## Anexo II

Carta de aprovação de adendo no comitê de ética no uso de animais (CEUA/UFRGS) para utilização de fêmeas



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO**

**Processo Nº: 31001**

**TÍTULO: MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA (PK/PD) DA QUETIAPINA NANOENCAPSULADA EM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA**

**Pesquisador Responsável: TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA**

Comissão De Ética no Uso De Animais aprovou o adendo ao projeto intitulado **“Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) da Quetiapina Nanoencapsulada em Modelo Animal de Esquizofrenia”**, em reunião realizada em 29/08/2016 - Sala 323 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 119 ratos Wistar de 90 dias de idade, 20 machos e 99 fêmeas, provenientes do CREAL-UFRGS; aprova-se também a utilização de 176 ratos Wistar machos e 176 (75 adendo 1 + 101 adendo 2) ratos Wistar fêmeas provenientes do cruzamento dos referidos animais. O projeto está de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e às normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

**Porto Alegre, 09 de setembro de 2016**

**Marcelo Meller Alievi**  
**Coordenador da CEUA/UFRGS**