

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Lorena Figueiredo Fernandes

LIPOSSOMAS COMO NANOCARREADORES DE ANGIOTENSINA-(1-7) PARA O
SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO

Belo Horizonte
2017

Lorena Figueiredo Fernandes

LIPOSSOMAS COMO NANOCARREADORES DE ANGIOTENSINA-(1-7) PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. André Ricardo Massensini

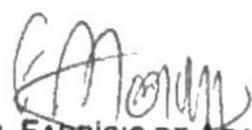
Coorientador: Prof. Frederic Jean G. Frezard

Belo Horizonte
2017

"LIPOSSOMAS COMO NANOCARREADORES DE FÁRMACOS PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO"

LORENA FIGUEIREDO FERNANDES

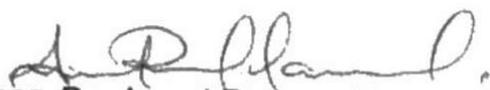
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de novembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR. MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2017

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC) e no Nanolab do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), e no laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao prof. André que me aceitou como aluna desde a graduação e vem me orientando por todo esse tempo. Também ao prof. Frezard que aceitou ser meu coorientador desde a graduação e me ensinou toda a parte relacionada a nanotecnologia.

Gostaria de agradecer muito à toda a minha família, meus pais e meu irmão, que me apoiam e me acompanham em tudo que eu faço, me ajudando a superar desafios e me mostrando que sempre devo seguir os meus sonhos.

A todos os alunos do prof. André do Núcleo de Neurociências. Às pós-docs Iaci e Talita que tiveram papel fundamental no primeiro ano do meu mestrado, e a pós-doc Gisele que contribuiu de forma muito significativa nos experimentos e discussões finais dos resultados. À aluna de mestrado Beatriz e aos alunos de iniciação científica Isabelle e Marco Túllio, que me ajudaram com os experimentos ao longo de todo o mestrado.

Também a todos os professores e alunos do NNC que me ajudaram com discussões, sugestões e ensinamentos durante todo o mestrado, muito obrigada.

Aos profs. Valbert e Simone da faculdade de Farmácia que aceitaram contribuir com o projeto na parte de análises dos lipossomas, e ao prof. Robson que colaborou com os experimentos com Ang-(1-7).

E todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e possibilitaram que esse trabalho fosse realizado e finalizado da maneira como foi.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das maiores causas de morte e incapacidade no mundo todo. Atualmente, o único tratamento disponível para o AVE é o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), contudo o número de pacientes elegíveis para seu uso é limitado, devido aos seus efeitos adversos e pequena janela terapêutica. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um peptídeo endógeno do sistema renina-angiotensina, que tem mostrado efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a Ang-(1-7) é rapidamente metabolizada, e, por isso, a utilização de nanopartículas, como os lipossomas, é uma alternativa para prevenir essa rápida degradação e assim possibilitar que a Ang-(1-7) chegue ao seu alvo de ação e desempenhe suas funções. Lipossomas são vesículas compostas por uma bicamada lipídica, com núcleo aquoso. Elas são biodegradáveis e biocompatíveis e tem o potencial de aumentar a entrega e eficácia de fármacos utilizados no tratamento do AVE. Portanto, seu uso como carreadores de fármacos para o Sistema Nervoso Central (SNC) é uma ferramenta promissora para o tratamento do AVE. Nesse estudo, lipossomas foram marcados com a sonda fluorescente Dil (1,1'dioctadecil-3,3',3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato), e em seguida encapsulados com Ang-(1-7). Além disso, análises de biodistribuição e cinética foram realizadas 1,5h, 4h e 24h após a injeção intravenosa de lipossomas vazios ou com Ang-(1-7), em camundongos da linhagem CD1. Em paralelo, camundongos CD1 foram submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAo), e imediatamente após a reperfusão, receberam injeção intravenosa de lipossomas vazios ou com Ang-(1-7). Para detecção dos lipossomas nos órgãos analisados nos experimentos de biodistribuição e nos cérebros isquemiados, imagens foram coletadas por fluorescência. Os resultados mostraram fluorescência tanto no plasma quanto no cérebro, 24h após a injeção dos lipossomas, assim como no fígado, baço e nos rins, o que sugere captura e metabolização pelo fígado e baço e eliminação da sonda pelos rins. Além disso, foi observada a presença de fluorescência na região isquêmica de animais MCAo. De um modo geral, os resultados sugerem que esse tipo de sistema nanocarreador é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (biodistribuição) e se acumular na região isquêmica de animais que submetidos à MCAo, apresentando assim grande potencial para tratamento do AVE.

ABSTRACT

Stroke is one of the leading causes of death and serious long-term disability worldwide. The only therapeutic agent available is tissue-type plasminogen activator (t-PA), however the number of potential patients is limited because of its side effects and narrow therapeutic window. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], an endogenous peptide from the renin-angiotensin system, has shown neuroprotective effects in *in vitro* and *in vivo* ischemia models. Ang-(1-7) is rapidly metabolized and to overcome this issue liposome nanoparticle encapsulation is a valuable approach to prevent degradation of the peptide. Liposomes are vesicles consisting of one or more lipid bilayers surrounding an aqueous compartment. Liposomes are biodegradable, biocompatible, and are able to increase drug efficacy in models of stroke, therefore the use of liposomes as Ang-(1-7) carriers to the Central Nervous System is an asset for ischemic stroke therapy. In this study, liposomes were labeled with the fluorescent probe Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate), followed by Ang-(1-7) encapsulation. Biodistribution and kinetics analyses were performed using CD1 mouse, at 1.5h, 4h and 24h after intravenous injection of empty and loaded liposomes. In parallel, CD1 mice underwent temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) surgery. Immediately after reperfusion, liposomes were intravenously injected. To analyze the biodistribution of the liposomes in the chosen organs and in the MCAO mice brain fluorescent images were made. The *in vivo* experiments demonstrated that fluorescence was detected in the plasma and in the brain after 24h of injection, that liposome possibly underwent liver and spleen metabolism and that the fluorescent label was eliminated by the kidneys. In addition, liposomes were observed in the ischemic region of MCAO mice brain. Overall the results showed that this type of delivery system can cross the blood brain barrier (biodistribution) and accumulate in the ischemic core of MCAO animals, thereby presenting high potential for stroke treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Barreira Hematoencefálica.....	3
Figura 2: Mecanismos de passagem de diferentes tipos de moléculas pela BHE.	7
Figura 3: Características estruturais dos lipossomas.....	14
Figura 4: Desenho esquemático do AVE hemorrágico e isquêmico.	19
Figura 5: Cascata simplificada de eventos fisiopatológicos que ocorrem na região isquêmica.....	21
Figura 6: Vias metabólicas dos peptídeos derivados da angiotensina.....	24
Figura 7: Esquema síntese de lipossomas.....	30
Figura 8: Ilustração da cirurgia de oclusão da artéria cerebral média.....	32
Figura 9: Delineamento experimental dos animais que passaram por cirurgia MCAo ou Sham.....	34
Figura 10: Delineamento experimental da biodistribuição e cinética dos lipossomas no plasma.....	35
Figura 11: Valores da caracterização dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) em PBS e em aCSF.....	37
Figura 12: Curva padrão de Ang-(1-7) em metanol.....	38
Figura 13: Perfil de biodistribuição da fluorescência entre os órgãos de camundongos em diferentes tempos após administração dos lipossomas vazios marcados com Dil.	39
Figura 14: Perfil de biodistribuição da fluorescência entre os órgãos de camundongos em diferentes tempos após administração dos lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil.....	40
Figura 15: Cinética plasmática dos lipossomas contendo ou não Ang-(1-7) marcados com Dil em tempos diferentes.....	41
Figura 16: Porcentagem do fluxo sanguíneo nos animais sham e MCAo durante o período de isquemia.....	42
Figura 17: Imagens In Vivo Xtreme do cérebro de camundongos após administração de lipossomas vazios marcados com Dil.	44
Figura 18: Análise semi-quantitativa da fluorescência no hemisfério direito em comparação com o esquerdo em camundongos que receberam lipossomas vazios marcados com Dil.	45
Figura 19: Imagens In Vivo Xtreme do cérebro de camundongos após administração de lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil.....	47
Figura 20: Análise semi-quantitativa da fluorescência no hemisfério direito em comparação com o esquerdo em camundongos que receberam lipossomas contendo Ang-(1-7) marcados com Dil.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Lista das soluções utilizadas nos experimentos	28
Tabela 2: Características dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) em PBS e em aCSF	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	artéria basilar
ACC	artéria carótida comum
ACE	artéria carótida externa
ACI	artéria carótida interna
ACM	artéria cerebral média
ACP	artéria cerebral posterior
aCSF	fluido cérebro espinhal artificial
ANG-(1-7)	angiotensina-(1-7)
APP	artéria pterigopalatino
AVE	acidente vascular encefálico
ATP	adenosina trifosfato
AT1R	receptor de angiotensina do tipo I
AT2R	receptor de angiotensina do tipo II
BHE	barreira hematoencefálica
CED	convection enhanced delivery
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CHOL	colesterol
Da	Daltons
Dil	1,1'dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato
DPM	desvio padrão da média
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSPC	diestearoil-fosfatidilcolina
DSPE-PEG2000	diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000
ECA	enzima conversora de angiotensina
ECA2	enzima conversora de angiotensina 2
GLUT1	transportador de glicose 1
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LUV	vesículas unilamelares grandes
PBS	tampão fosfato
PDI	índice de polidispersão

PEG	polietilenoglicol
P-gp	glicoproteína-P
MCAo	oclusão da artéria cerebral média
MLV	vesículas multilamelares
mV	milivolts
NMDAR	receptor N-metil-D-aspartato
nm	nanômetro
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
ROS	espécies reativas de oxigênio
SFM	sistema fagocitário mononuclear
SNC	sistema nervoso central
SRA	sistema renina-angiotensina
SUV	vesículas unilamelares pequenas
Tc	transição de fase
TE	taxa de encapsulação
t-PA	ativador de plasminogênio tecidual
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1	SISTEMA NERVOSO CENTRAL	2
2.1.1	<i>Cérebro</i>	2
2.1.2	<i>Barreira Hematoencefálica</i>	2
2.1.3	<i>Alteração da permeabilidade da BHE em situações patológicas</i>	5
2.2	MECANISMOS DE TRANSPORTE PELA BHE E ENTREGA DE FÁRMACOS	6
2.2.1	<i>Mecanismos fisiológicos de transporte pela BHE</i>	6
2.2.2	<i>Estratégias para entrega de fármacos no SNC</i>	8
2.3	NANOPARTÍCULAS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS PARA O SNC	12
2.3.1	<i>Lipossomas</i>	13
2.4	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO E TRATAMENTO	18
2.4.1	<i>Acidente Vascular Encefálico</i>	19
2.4.2	<i>Tratamento farmacológico do AVE isquêmico</i>	22
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVO GERAL	27
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MÉTODOS	28
5.1	SOLUÇÕES	28
5.2	ANIMAIS	28
5.3	PREPARO DE LIPOSSOMAS	28
5.4	PREPARO DOS LIPOSSOMAS COM ANGIOTENSINA-(1-7)	29
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	30
5.6	CIRURGIA DE ISQUEMIA (OCCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA)	31
5.7	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	33
5.8	IMAGENS IN VIVO XTREME	33
5.9	BIODISTRIBUIÇÃO E CINÉTICA DOS LIPOSSOMAS NO PLASMA DE ANIMAIS NAÍVE	34
5.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
6	RESULTADOS	36
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS VAZIOS E COM ANG-(1-7)	36
6.2	BIODISTRIBUIÇÃO DOS LIPOSSOMAS VAZIOS E COM ANG-(1-7)	38

6.3	CINÉTICA PLASMÁTICA DOS LIPOSSOMAS VAZIOS E COM ANG-(1-7) EM ANIMAIS NAÏVE	41
6.4	DISTRIBUIÇÃO DOS LIPOSSOMAS NA REGIÃO ISQUÊMICA	41
7	DISCUSSÃO	49
7.1	CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS VAZIOS E COM ANG-(1-7)	49
7.2	BIODISTRIBUIÇÃO E CINÉTICA DOS LIPOSSOMAS	51
7.2.1	<i>Biodistribuição</i>	51
7.2.2	<i>Cinética no plasma</i>	53
7.3	CONCENTRAÇÃO DOS LIPOSSOMAS NA REGIÃO ISQUÊMICA	54
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
9	CONCLUSÃO	58
10	REFERÊNCIAS	59
11	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

É estimado que pelo menos 1,5 bilhão de pessoas no mundo sofrerão de algum tipo de doença do Sistema Nervoso Central (SNC), situação que se agrava cada vez mais com o aumento da população idosa acima de 70 anos. E essas doenças, além de afetarem a economia do país em termos de custos com planos de saúde (custos diretos), também trazem efeitos indiretos no que diz respeito à perda de produtividade do paciente (Tiwari and Amiji 2006). Além disso, desordens como o Acidente Vascular Encefálico (AVE), Epilepsia, Depressão e Esquizofrenia apresentam altos níveis de mortalidade (Pan, Sun et al. 2011).

Todas essas questões evidenciam o quanto é importante o estudo de novas formas de tratamento para doenças que afetam o SNC, mas o grande problema quando o foco é o tratamento de doenças no SNC é a chegada do fármaco ao seu alvo terapêutico, nesse caso, o tecido cerebral (Alyautdin, Khalin et al. 2014).

O cérebro é um órgão que possui barreiras que o protegem e impedem que substâncias nocivas entrem em contato com o tecido e causem danos. Uma dessas barreiras é a barreira hematoencefálica (BHE) (Larsen, Martin et al. 2014).

A BHE é formada pelas células endoteliais dos capilares que chegam tanto na medula quanto no cérebro, além de também possuir outros componentes celulares perivasculares, como os pericitos (Alyautdin, Khalin et al. 2014). E devido à presença de junções entre essas células endoteliais, elas se apresentam bem próximas umas das outras formando uma barreira para a entrada de solutos (van Tellingen, Yetkin-Arik et al. 2015). Dessa forma, muitos fármacos também não conseguem atravessar essa barreira, o que dificulta o tratamento de doenças no SNC e, por isso, várias alternativas foram criadas na tentativa de ultrapassar essa barreira. Uma delas que vem ganhando muito destaque é a utilização de nanopartículas como nanossistemas carreadores de fármacos (Zhang, Li et al. 2016).

Nanopartículas são sistemas coloidais compostos por polímeros ou lipídeos e que variam de 10 a 1000nm de tamanho (Zhang, Li et al. 2016). Dentre as nanopartículas estão presentes os lipossomas que são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas que isolam compartimentos aquosos

internos do meio externo (Frezard 1999). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis, não imunogênicos e incorporarem tanto fármacos polares quando apolares, os lipossomas oferecem opções terapêuticas eficientes em diversos contextos, incluindo doenças que afetam SNC (Ishii, Asai et al. 2013). Seu estudo no tratamento do AVE tem mostrado bons resultados, uma vez que há um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica durante o AVE, contribuindo para o acúmulo de lipossomas na região afetada pela isquemia (Fukuta, Asai et al. 2016).

Por isso esse trabalho tem o intuito de mostrar a utilização desse sistema de carreamento de fármacos como estratégia promissora para melhoria do tratamento de doenças do SNC como, por exemplo, o AVE.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema Nervoso Central

2.1.1 Cérebro

O cérebro é um órgão que controla a maioria das funções do nosso corpo como movimentos, comunicação, tomada de decisões e emoções. E por causa da sua grande importância e da sua baixa capacidade regenerativa (Bjorklund and Lindvall 2000) foram desenvolvidos obstáculos para impedir que substâncias nocivas penetrem esse tecido podendo causar danos (Larsen, Martin et al. 2014). Nesse contexto, a barreira hematoencefálica entra como um obstáculo, impedindo que várias substâncias penetrem nesse sistema (Alyautdin, Khalin et al. 2014).

2.1.2 Barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura especializada que tem a função de manter o microambiente específico necessário para o funcionamento do cérebro e também protegê-lo contra compostos neurotóxicos que podem estar presentes no sangue (Tam, Sosa et al. 2016). A existência da BHE foi primeiramente descrita por Ehrlich há mais de 100 anos (Reinhold and Rittner 2017). Essa barreira restringe a passagem de substâncias tóxicas, enquanto permite a entrada de nutrientes essenciais para o tecido cerebral (Sifat, Vaidya et al. 2017). Ela é formada por uma camada de células endoteliais que circundam a microvasculatura cerebral (Tam, Sosa et al. 2016). Esses capilares interagem

intimamente com pericitos e astrócitos, sendo que os pericitos compartilham a membrana basal com as células endoteliais, e os astrócitos formam camadas mais externas dos capilares maduros. Pericitos e astrócitos também são responsáveis por secretar as proteínas da matriz extracelular da membrana basal (Reinhold and Rittner 2017).

Além disso, as células endoteliais também interagem com neurônios e outras estruturas de suporte (microglia e oligodendrócitos) (Sifat, Vaidya et al. 2017) e a ação coordenada dessas células vasculares (endoteliais, pericitos), glias (astrócitos, oligodendrócito, microglia) e dos neurônios é conhecida como unidade neurovascular (Reinhold and Rittner 2017), permitindo a formação de uma estrutura dinâmica e funcional (figura 1), a BHE.

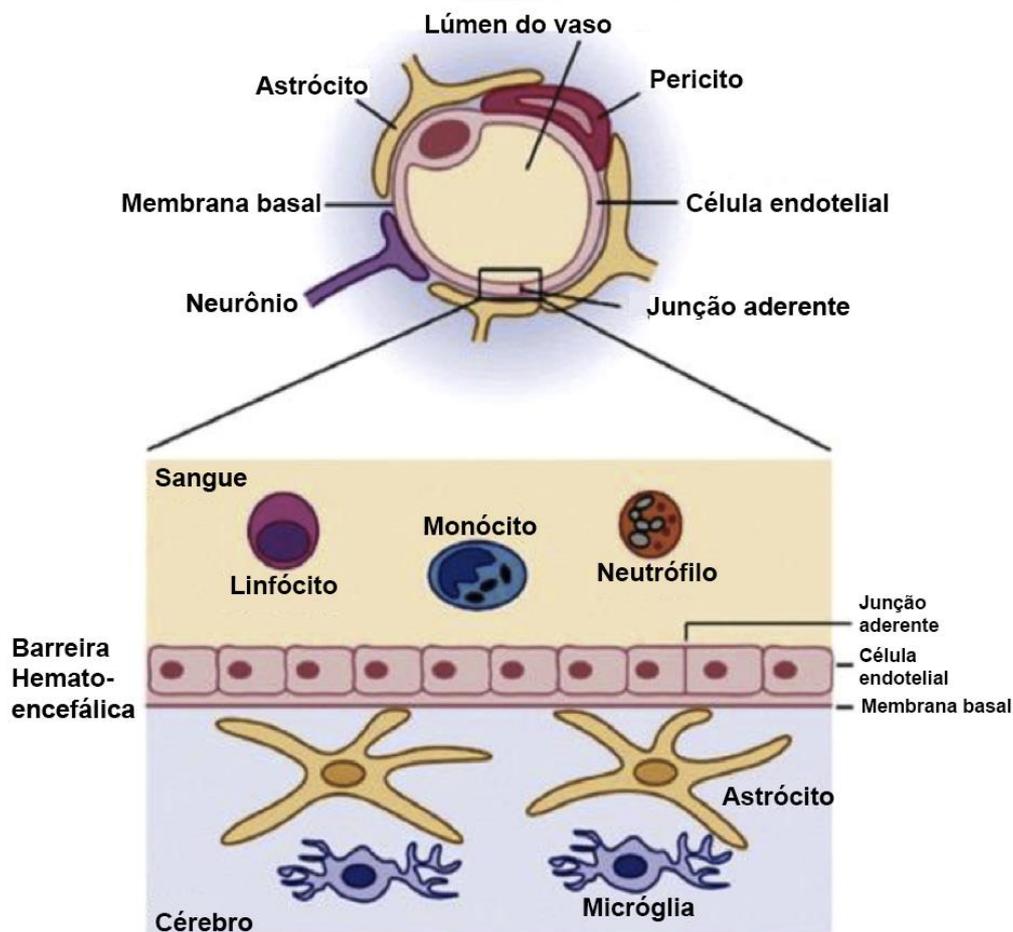


Figura 1: Barreira Hematoencefálica.

Desenho representativo de uma secção de um capilar cerebral mostrando detalhes da composição da Barreira Hematoencefálica. Obtido com autorização e modificado de (Tam, Sosa et al. 2016).

As células endoteliais cerebrais compartilham características semelhantes às células endoteliais periféricas, mas também apresentam aspectos bastante diferentes (Azad, Pan et al. 2015). Um desses aspectos é a existência de menor número de vesículas endocíticas e a presença de junções aderentes que limitam o transporte transcelular (pelas células) e paracelular (por entre as células) de moléculas para o SNC (Azad, Pan et al. 2015). Também são encontrados sistemas de transporte específicos que regulam a entrada de compostos necessários para o metabolismo cerebral, e os mais comuns dentre eles são os transportadores cassetes ligados a Adenosina trifosfato (ATP) (ABC) (Begley and Brightman 2003, Jones and George 2004). Além disso, também é possível observar a presença de enzimas extra e intracelulares capazes de metabolizar substâncias que vão desde peptídeos até neurotoxinas, o que promove certa resistência à entrada desses compostos (el-Bacha and Minn 1999).

As junções aderentes, que permitem a interação íntima entre as células endoteliais, no cérebro são mais complexas do que as encontradas em tecidos periféricos, e servem como barreira à difusão paracelular de solutos. E dentre a família dos transportadores ABC um dos mais importantes, no que diz respeito à manutenção da integridade e polaridade da BHE, é a bomba de efluxo conhecida como glicoproteína-P (P-gp) (Azad, Pan et al. 2015). Esses transportadores utilizam energia em forma de ATP para transportar seus substratos para fora do SNC, sendo muitos desses substratos os próprios fármacos (Alyautdin, Khalin et al. 2014).

Além disso, as outras estruturas celulares encontradas na BHE como os astrócitos (link entre células endoteliais e neurônios) e pericitos (localizados na região perivascular), por exemplo, também desempenham importantes funções na manutenção da estrutura da barreira (Azad, Pan et al. 2015).

Com isso, somente pequenos compostos lipofílicos (menor que 500 Da), como O₂ ou hormônios esteroides, conseguem se difundir pela BHE, facilitado pelo seu gradiente de concentração (Tam, Sosa et al. 2016). Todas as outras substâncias, inclusive glicose, aminoácidos e íons necessitam de transportadores ativos que possibilitam sua entrada no SNC (Tiwari and Amiji 2006).

Infelizmente isso traz um enorme problema para o tratamento de doenças do SNC. Muitos dos fármacos existentes não conseguem atravessar essa barreira uma vez que eles não possuem características lipofílicas e são, na sua maioria, moléculas grandes (Tam, Sosa et al. 2016). Isso significa que muitas doenças do SNC como Alzheimer, esclerose múltipla e AVE não podem ser tratadas pela maioria dos fármacos, se forem administrados na sua forma livre (Pardridge 2002).

2.1.3 Alteração da permeabilidade da BHE em situações patológicas

Apesar da presença de toda essa estrutura funcional na BHE, já se sabe que durante situações patológicas, como doenças neurodegenerativas e no AVE, a permeabilidade da barreira hematoencefálica é aumentada, o que, por um lado, pode facilitar a entrada de fármacos que até então não conseguiam atravessá-la (Fukuta, Asai et al. 2016), mas, por outro, contribui na piora dos processos patológicos dessas doenças (Reinhold and Rittner 2017). Essa alteração na permeabilidade da BHE pode ser encontrada como um processo fisiopatológico primário ou secundário, dependendo da doença (Reinhold and Rittner 2017).

Na Doença de Alzheimer pacientes sofrem de disfunção da unidade neurovascular, além de neurodegeneração progressiva, perda seletiva de neurônios e acúmulo de proteínas no cérebro. Essa hipótese da disfunção neurovascular, sugere que danos cerebrovasculares e a ruptura da unidade neurovascular contribuem para o desenvolvimento e progressão do declínio cognitivo (Reinhold and Rittner 2017).

Já em isquemias como o AVE, onde há a hipoperfusão de alguma região do cérebro, a falta de oxigênio e glicose leva a um estresse anaeróbico, iniciando uma série de cascatas que irão culminar com liberação de espécies reativas de oxigênio e desenvolvimento de inflamação. Esses eventos, por sua vez, irão afetar diretamente a permeabilidade da BHE, levando a um edema citotóxico e vasogênico, o que pode piorar os sintomas da doença (Jiang, Andjelkovic et al. 2017).

Independente do mecanismo fisiopatológico presente, o aumento da permeabilidade da BHE é um fator importante encontrado na maioria das doenças do SNC e que deve ser estudado, podendo propiciar tanto a descoberta de

fármacos que possam promover a proteção dessa barreira e assim proteger o tecido cerebral dos danos causados por esse aumento de permeabilidade (Reinhold and Rittner 2017), quanto o desenvolvimento de terapias que possam fazer uso desse aumento de permeabilidade para possibilitar a chegada de fármacos no local de interesse, no caso, o tecido cerebral e, assim tratá-lo (Jiang, Andjelkovic et al. 2017).

2.2 Mecanismos de transporte pela BHE e entrega de fármacos

2.2.1 Mecanismos fisiológicos de transporte pela BHE

Existem vários mecanismos pelos quais solutos são transportados pela BHE para o SNC. Substâncias hidrofílicas se difundem pelas junções aderentes via o mecanismo paracelular (extracelular), enquanto as moléculas lipofílicas, como colesterol e álcool, se dissolvem pela membrana lipídica das células, pela via transcelular. (Tam, Sosa et al. 2016, Patel and Patel 2017). Mas para todas as outras moléculas esse transporte ocorre através de outros mecanismos, como a transcitose mediada por absorção, por receptor ou por carreador e a endocitose mediada por células (figura 2). E com isso, os sistemas de entrega de fármacos também fazem uso dessas vias como forma de entrada no SNC (Patel, Goyal et al. 2009, Chen and Liu 2012, Tam, Sosa et al. 2016).

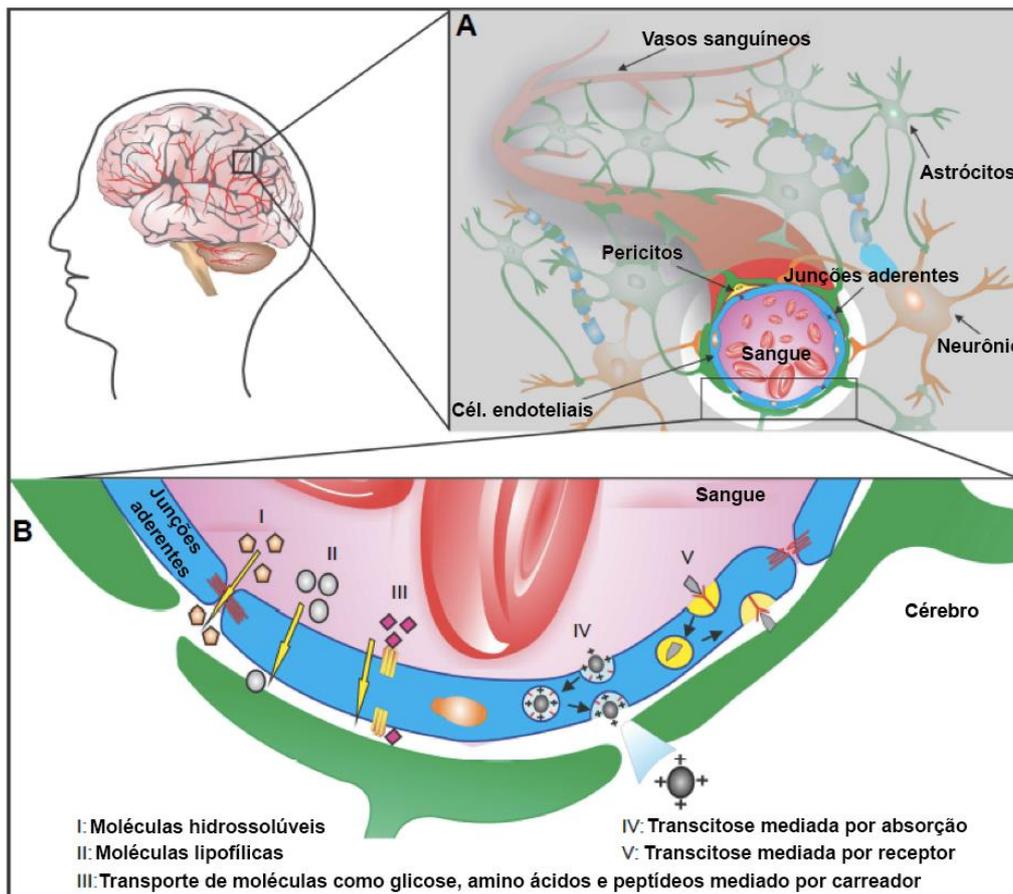


Figura 2: Mecanismos de passagem de diferentes tipos de moléculas pela BHE.

As moléculas menores conseguem passar pela membrana pela via paracelular (hidrossolúveis) ou transcelular (lipofílicas). Já as moléculas maiores necessitam de transportadores que possibilitam a chegada ao tecido cerebral. Obtido com autorização e traduzido de (Vieira and Gamarra 2016)

A transcitose mediada por absorção é baseada na interação eletrostática entre uma carga positiva presente em alguma molécula e a carga negativa existente na membrana celular das células endoteliais (Beduneau, Saulnier et al. 2007). Um dos exemplos de transporte que ocorre por essa via é o da albumina, e estudos também mostraram que a utilização de nanopartículas com albumina catiônica foi eficiente em atravessar a BHE levando peptídeos (Xu, Lu et al. 2009).

Nutrientes como glicose, lactose e aminoácidos neutros, necessários para a sobrevivência do organismo, são entregues ao tecido cerebral através da utilização de proteínas presentes na superfície da BHE, que funcionam como carreadores dessas moléculas. Uma dessas proteínas, que é altamente expressa nesses locais, é o transportador de glicose (GLUT1) que promove a entrada de D-glicose e seus análogos no SNC (Beduneau, Saulnier et al. 2007). Fármacos podem ser modificados quimicamente de modo a se parecer com o nutriente, como no caso da

L-DOPA, ou o substrato do transportador pode ser conjugado a algum sistema carreador de fármaco, permitindo assim seu transporte através da membrana (Mora, Sagrista et al. 2002). Mas as aplicações desse método são reduzidas, uma vez que o fármaco/ligante deve ser pequeno e com estrutura similar a do nutriente (Gabathuler 2010).

Já, a transcitose mediada por receptor tem a função de transportar moléculas grandes como insulina ou transferrina, e ela se dá pela interação do ligante natural ou algum artificial (anticorpo), com o receptor presente na membrana celular. Essa interação induz o processo de endocitose da macromolécula para uma vesícula intracelular, que por sua vez, vai atravessar o endotélio da BHE e ser liberada no tecido cerebral (Jones and Shusta 2007). O receptor de transferrina tem sido muito estudado, e alguns trabalhos se baseiam na técnica de ligar a própria molécula de transferrina ou algum anticorpo contra essa molécula, à nanocarreadores de modo a facilitar o transporte de macromoléculas pela BHE (Chen and Liu 2012).

E finalmente, a endocitose mediada por células, se baseia no uso das células do nosso corpo como transportadores. Células como macrófagos e neutrófilos recrutados durante um processo inflamatório de qualquer doença do SNC, são eficientemente capazes de atravessar a barreira BHE e chegar à inflamação, servindo como “cavalos de Tróia” carregando o fármaco com elas para o tecido cerebral (Patel and Patel 2017). Alguns estudos mostraram o uso de monócitos e macrófagos derivados de monócitos (Tong, Kang et al. 2016). Contudo esse método apresenta algumas desvantagens como baixa taxa de encapsulamento de fármacos, liberação prematura do agente e baixa seletividade (Batrakova, Gendelman et al. 2011).

2.2.2 Estratégias para entrega de fármacos no SNC

Dentre os métodos utilizados para atravessar a BHE e possibilitar a entrega do fármaco no SNC, podemos citar duas grandes classes: os métodos invasivos e não invasivos. Os métodos invasivos se baseiam na entrega do fármaco diretamente ao parênquima cerebral ou no aumento transitório da permeabilidade

da BHE. Já os não invasivos se baseiam em mecanismos celulares endógenos para facilitar a entrada dos fármacos no SNC (Tam, Sosa et al. 2016).

2.2.2.1 Métodos invasivos

Com a intenção de aumentar a passagem de fármacos pela BHE e assim, possivelmente, melhorar o tratamento das doenças do SNC, foram desenvolvidas técnicas para aumentar a permeabilidade dessa barreira, ou seja, afastando as células endoteliais umas das outras (Stockwell, Abdi et al. 2014). Uma dessas técnicas utiliza o choque osmótico promovendo o encolhimento das células e assim a ruptura das junções aderentes (Bellavance, Blanchette et al. 2008). O manitol é um dos agentes mais estudados, nesse caso, (Crawford, Rosch et al. 2016) e ele vem sendo usado em terapias gênicas (Foley, Rubin et al. 2014), juntamente com nanopartículas (Sun, Worden et al. 2014), peptídeos (Yao and May 2013), dentre outros. Mas apesar dos trabalhos citados anteriormente terem mostrado resultados satisfatórios, ainda há alguns problemas com relação ao manitol, como por exemplo a sua translação para outros modelos animais, além de roedores (Joshi, Ergin et al. 2011), e também o próprio insucesso no aumento da permeabilidade da BHE, após administração de manitol via intravenosa (Chen, Wei et al. 2013). Portanto, muito estudo ainda deve ser feito de modo a melhorar essa técnica.

Outra técnica, mais recente, é a utilização do ultrassom para promover esse aumento da permeabilidade da BHE. Nesse caso, microbolhas, que podem variar entre 1 e 10 μm , irão promover a ruptura das junções mecanicamente (Tam, Sosa et al. 2016). Essa técnica também vem sendo utilizada juntamente com nanopartículas e tem mostrado resultados satisfatórios. Etame e colaboradores conseguiram um aumento de 336% na entrada de nanopartículas peguiladas de ouro, no tecido cerebral (Etame, Diaz et al. 2012). No entanto, alguns parâmetros da técnica como concentração das microbolhas, frequência do pulso, entre outros ainda precisam ser mais estudados de modo a garantir maior segurança (Crawford, Rosch et al. 2016).

Ainda entre os métodos invasivos, há também a entrega de fármacos diretamente no parênquima cerebral ou intracerebroventricular (Tam, Sosa et al. 2016). Essa técnica está isenta do obstáculo oferecido pela BHE e permite uma entrega mais seletiva de fármacos, o que reduz os efeitos adversos, mas a difusão

no tecido cerebral é bastante reduzida, devendo ser feito um mapeamento bem preciso da região na qual o fármaco será injetado, de modo a se obter sucesso na injeção (Gabathuler 2010). A utilização da CED (do inglês *convection enhanced delivery*) que também é uma técnica de injeção intracerebral, utiliza a pressão hidrostática positiva de modo a aumentar a difusão de moléculas no tecido (Bobo, Laske et al. 1994).

O grande problema de todas as técnicas invasivas é devido ao alto custo neurocirúrgico e o aumento no risco de infecções, uma vez que elementos indesejados podem entrar no SNC quando a BHE é exposta (Tam, Sosa et al. 2016). Portanto, o desenvolvimento de outras alternativas menos invasivas é bastante desejado.

2.2.2.2 Métodos não invasivos

As técnicas não invasivas irão explorar os mecanismos fisiológicos de passagem pela BHE, já citados, na tentativa de melhorar a entrada de fármacos no SNC (Tam, Sosa et al. 2016). Dentre essas técnicas, podemos citar a administração intranasal de fármacos, a modificação química e uso de nanopartículas.

A administração intranasal tem se mostrado uma técnica bastante interessante, uma vez que ela é uma rota alternativa que reduz exposição do resto do organismo à molécula testada e também reduz a sua degradação (Meredith, Salameh et al. 2015). Além disso, após a administração intranasal a molécula é absorvida pela mucosa nasal e entra no cérebro pela via do nervo olfatório ou do trigêmeo, ou seja, não há a presença da BHE (Hanson and Frey 2008). Essa técnica vem sendo estudada juntamente com proteínas, pequenas moléculas, nanopartículas, entre outros (Crawford, Rosch et al. 2016). A utilização de nanopartículas vem sendo bem explorada uma vez que elas permitem uma liberação prolongada do fármaco e, dessa forma, supera uma desvantagem desse sistema, que é o alto clearance realizado pela mucosa nasal (Crawford, Rosch et al. 2016). Mas essa técnica ainda possui algumas restrições, uma vez que só é aplicável a fármacos potentes que necessitam de baixos volumes de administração, e por isso, nem todos as moléculas são elegíveis para a via intranasal (Patel and Patel 2017).

Como as moléculas que conseguem atravessar a BHE via difusão passiva são moléculas pequenas (menor que 500 Da), com alta lipofilicidade e não ionizáveis no pH fisiológico (Lipinski, Lombardo et al. 2001), foram feitas tentativas químicas de transformar substâncias terapêuticas já conhecidas em moléculas mais lipofílicas.

Contudo, a exploração das outras vias de passagem pela BHE, transcitose mediada por carreador, receptor ou absorção, já obteve mais sucesso, como na síntese de pro-fármacos capazes de atravessar a BHE, caso da L-DOPA usada no tratamento do Parkinson (Rautio, Laine et al. 2008). Esse pro-fármaco foi sintetizado de modo a aumentar sua afinidade pelo transportador de L-amino ácido, altamente eficiente no transporte de amino ácidos neutros, explorando assim a transcitose mediada por carreadores (Gynther, Laine et al. 2008). O problema dessa técnica é que as modificações químicas podem acabar alterando muito a estrutura da molécula e assim sua eficiência terapêutica, e por isso, também é uma técnica limitada (Dwibhashyam and Nagappa 2008).

A área de nanomedicina tem ganhado bastante atenção no que diz respeito a tratamento de doenças do SNC (Wong, Wu et al. 2012), devido ao seu alto potencial de realização de uma entrega seletiva do fármaco ao seu alvo terapêutico (Tam, Sosa et al. 2016). A administração sistêmica de fármacos via intravenosa é ineficiente, uma vez que reduzida quantidade do fármaco realmente atravessa a BHE, além de também causar efeitos adversos em áreas saudáveis expostas à molécula (Chapman, Frey et al. 2013). Com o uso de nanocarreadores, como lipossomas e nanopartículas, com motivos específicos em suas superfícies, há aumento da entrega do agente terapêutico no tecido cerebral, além de uma ação mais seletiva da nanopartícula, o que reduz os efeitos adversos (Koo, Reddy et al. 2006).

Além disso, as nanopartículas também demonstraram capacidade de passagem passiva pela BHE com permeabilidade alterada (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016, Fukuta, Asai et al. 2016), o que seria uma propriedade interessante a ser explorada, uma vez que essa alteração é observada em várias doenças do SNC, como já foi citado anteriormente.

2.3 Nanopartículas como carreadores de fármacos para o SNC

As nanopartículas têm se tornado um dos maiores focos de estudo quando se diz respeito à entrega de fármacos no SNC, devido a características únicas que essas partículas possuem, como tamanho em escalas bem pequenas, capacidade de incorporação de alta quantidade de fármaco, maior estabilidade nos fluidos corporais e nas condições de armazenamento, capacidade de liberação controlada e alta especificidade de ação, entre outros (Alam, Beg et al. 2010, Gastaldi, Battaglia et al. 2014). Muitas nanopartículas têm a capacidade de atravessar a BHE, levando assim o fármaco para o tecido cerebral, principalmente após modificações em sua superfície (Fornaguera, Dols-Perez et al. 2015). Elas conseguem, ainda, evitar a fagocitose pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) o que aumenta a biodisponibilidade da molécula (Moghimi, Hunter et al. 2001) para atravessar a BHE aumentando também a sua posterior concentração no cérebro. Além disso, deve-se considerar a sua capacidade de atravessar a BHE com permeabilidade alterada em condições patológicas e concentrar-se na região afetada, como no caso da isquemia (Fukuta, Ishii et al. 2015, Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016).

Nanopartículas são sistemas coloidais compostos por polímeros ou lipídeos, de tamanho variando entre 10 a 1000nm, sendo os mais comuns entre 50 a 300nm (Zhang, Li et al. 2016). As substâncias bioativas estudadas podem ser embebidas na matriz das nanopartículas ou depositadas em sua superfície, e, além disso, toda a nanopartícula pode ser modificada de modo a permitir que esse sistema chegue a regiões específicas no corpo e de maneira controlada (Tancini, Tosi et al. 2015).

Para que as nanopartículas sejam utilizadas como carreadores de fármacos elas devem possuir as seguintes características: não serem tóxicas, serem biodegradáveis e biocompatíveis; ter diâmetro de preferência menor que 100nm; ser estável no sangue, sem haver agregação; a partícula deve evitar o sequestro pelo SFM e, conseqüentemente, ficar por tempo prolongado na circulação; deve ser capaz de entregar o fármaco ao tecido cerebral e assim atravessar a BHE (por transcitose mediada por receptor); deve ser capaz de encapsular pequenas moléculas, peptídeos e nucleotídeos; seus excipientes devem induzir o mínimo de

degradação química ou mudanças estruturais na droga; deve ser capaz de promover uma liberação controlada da substância encapsulada; e, finalmente ter um processo de produção econômico e eficiente (Zhang, Li et al. 2016).

Muitas nanopartículas vêm sendo desenvolvidas e hoje podemos encontrar diferentes tipos, como nanopartículas poliméricas, inorgânicas, lipossomas, nanofibras e micelas, sendo que algumas das mais utilizadas para entrega de drogas no SNC são as nanopartículas lipídicas, poliméricas, nanoemulsões, dendrímeros, dentre outras (Masserini 2013).

As nanopartículas lipídicas, como lipossomas, têm sido extensivamente estudadas como sistema carreador de fármacos para o SNC, e resultados satisfatórios vêm sendo produzidos (Puri, Loomis et al. 2009, Ishii, Asai et al. 2013, Fukuta, Ishii et al. 2015).

2.3.1 *Lipossomas*

Os lipossomas são a primeira geração de nanocarreadores de fármacos (Budai and Szogyi 2001). Eles são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas que isolam compartimentos aquosos internos do meio externo (Frezard 1999), figura 3. Normalmente, a bicamada de fosfolídeos é constituída de lípídeos biodegradáveis e biocompatíveis encontrados nas membranas biológicas, como esfingomielina, fosfatidilcolina e outros glicerofosfolídeos. O colesterol, também presente nas membranas celulares, é adicionado a formulações de lipossomas podendo aumentar ou diminuir a permeabilidade de sua bicamada lipídica e aumentar a estabilidade das vesículas em sistemas *in vivo* (Masserini 2013).

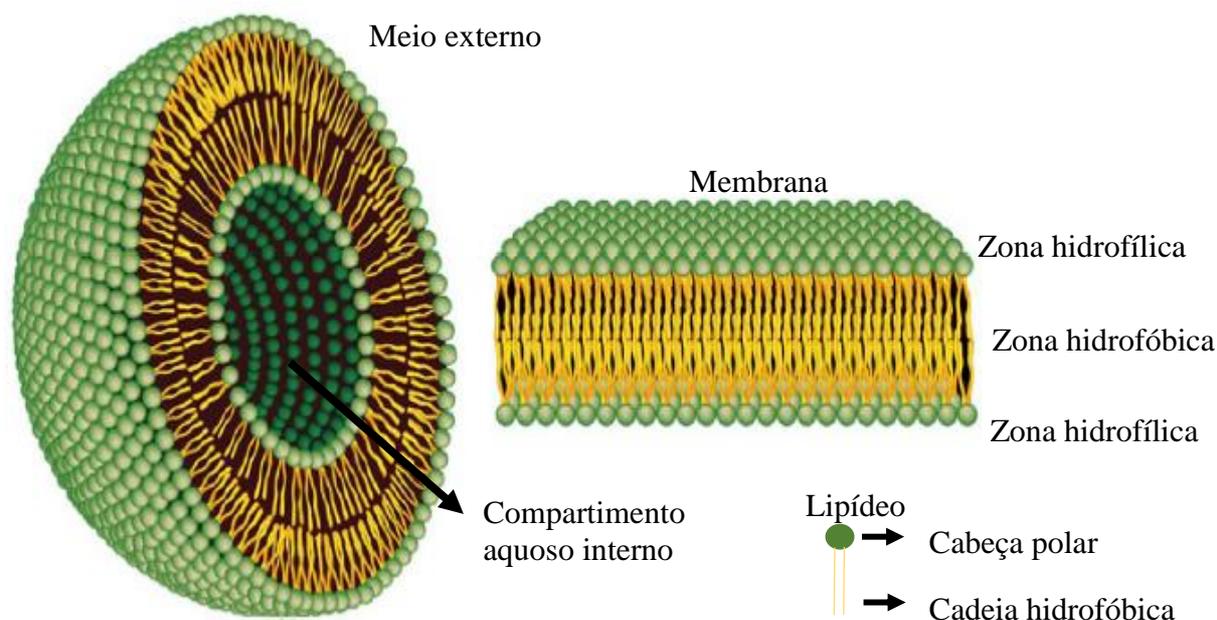


Figura 3: Características estruturais dos lipossomas.

Os lipossomas são vesículas que possuem um compartimento aquoso interno e uma bicamada lipídica. Os lipídeos que compõem essa membrana têm características anfifílicas, ou seja, uma parte polar e uma parte apolar, o que possibilita a formação da bicamada lipídica, assim como a membrana celular. Obtido com autorização e modificado de (Bozzuto and Molinari 2015).

Os fosfolipídeos são caracterizados por uma temperatura de transição de fase (T_c), na qual a membrana passa de uma fase gel (cadeia hidrocarbonada do lipídeo em estado ordenado) para uma fase cristal-líquido (moléculas ficam com movimentos mais livres e cadeias desordenadas e as cabeças polares tornam-se mais hidratadas). A composição da membrana influencia na T_c , e dessa forma, membranas compostas por lipídeos diferentes podem possuir níveis de fluidez diferentes, mesmo estando em uma mesma temperatura (Frézard, Schettini et al. 2005).

Os lipossomas são classificados de acordo com o seu tamanho e a quantidade de lamelas, sendo: as vesículas unilamelares pequenas (SUV), com tamanho até 100nm e somente uma bicamada lipídica; as vesículas unilamelares grandes (LUV), com tamanho maior que 100nm e uma bicamada lipídica; e as vesículas multilamelares, que podem chegar a diversos micrômetros de tamanho e possuem várias bicamadas lipídicas (Masserini 2013).

Essas vesículas são capazes de acomodar tanto fármacos lipofílicos, na sua bicamada lipídica, quanto fármacos hidrofílicos, no seu núcleo aquoso, o que os torna um sistema de entrega de fármacos bastante atrativo para diversas terapias

(Li, Tsibouklis et al. 2017). Eles também têm como vantagem o fato de apresentarem biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa toxicidade, serem um sistema de entrega de fármacos com possibilidade de alta seletividade e liberação prolongada (Torchilin 2005, Noble, Stefanick et al. 2014).

Contudo, há algumas limitações no uso desse sistema devido a possível baixa estabilidade após armazenamento, menor controle de liberação de substâncias bioativas, e rápida eliminação sistêmica (Wong, Wu et al. 2012). Mas pelo fato de serem vesículas muito versáteis, sendo que os lipossomas podem variar de acordo com o tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno (Frézard, Schettini et al. 2005), várias alterações podem ser feitas de modo a melhorar essas limitações encontradas.

Na tentativa de aumentar o seu tempo de circulação, o tamanho do lipossoma foi sendo reduzido (para a escala de nanômetros), e foram introduzidos polímeros como o polietilenoglicol (PEG) em sua superfície (Voinea and Simionescu 2002). Além disso, outros tipos de alterações foram realizados nessas vesículas, de modo que podemos separá-las em algumas classes: lipossomas de liberação prolongada, lipossomas responsivos à estímulos, lipossomas sítio-específicos e lipossomas carregados.

2.3.1.1 Lipossomas de circulação prolongada

Uma vez dentro do organismo, a estabilidade dos lipossomas no plasma, assim como a sua capacidade de agir em tecidos específicos, vai determinar a sua ação sobre aquele organismo. Enquanto eles estão na circulação sanguínea, os lipossomas interagem com proteínas plasmáticas, como as opsoninas, o que contribui para o seu reconhecimento pelo SFM e sua posterior eliminação (Bozzuto and Molinari 2015).

Os lipossomas convencionais, aqueles que não possuem nenhum tipo de alteração na sua superfície (primeira geração), têm como ponto negativo a rápida eliminação pelo processo citado acima (Gabizon, Shmeeda et al. 2006). Com isso, diferentes estratégias começaram a ser desenvolvidas na tentativa de aumentar o tempo do lipossoma na circulação sanguínea. Como resultado, o desenvolvimento de lipossomas como um sistema carreador de fármacos foi baseado na construção

de vesículas com capacidade de evitar a fagocitose pelo SFM, como vesículas pequenas, rígidas e com alta quantidade de colesterol, o que aumentou bastante a sua estabilidade no plasma (Kirby and Gregoriadis 1983). Outros métodos foram desenvolvidos, como introdução de lipídeos de polivinilpirrolidona poliacrilamida (Torchilin, Shtilman et al. 1994).

Contudo, a melhor estratégia nesse contexto foi descrita no início dos anos 90, quando grupos de cientistas demonstraram que a introdução de grupos peguados na superfície do lipossoma, era capaz de aumentar drasticamente a sua estabilidade e tempo na circulação sanguínea, após administração intravenosa, criando assim a segunda geração de lipossomas (Bozzuto and Molinari 2015).

PEG é um polímero de unidades de etileno (poliéter), com diversas características interessantes, como biocompatibilidade, solubilidade em soluções aquosas e orgânicas, baixa toxicidade, imunogenicidade e antigenicidade, além de possuir uma boa cinética de eliminação. As cadeias de PEG protegem os lipossomas do SFM formando uma camada hidrofílica protetora na sua superfície (Bozzuto and Molinari 2015).

2.3.1.2 Lipossomas responsivos a estímulos

Muitas vezes os lipossomas de circulação prolongada apresentam dificuldades em liberar seu conteúdo, por isso foram desenvolvidos os lipossomas responsivos a certos estímulos que podem vir do próprio tecido, como mudança no pH ou alteração do potencial redox, ou estímulos externos, como a temperatura, ultrassom, ou campo eletromagnético (Torchilin 2009, Perche and Torchilin 2013).

Os lipossomas sensíveis ao pH foram desenvolvidos ao se perceber que em algumas condições patológicas (tumores, inflamação) havia o desenvolvimento de um ambiente ácido, comparado a tecidos normais. Esses lipossomas são, normalmente, estáveis no pH fisiológico, mas podem passar por uma desestabilização e adquirir propriedades fusogênicas em pHs ácidos, liberando assim seu conteúdo (Simoes, Moreira et al. 2004).

Os lipossomas sensíveis às alterações do potencial redox são baseados na diferença existente entre os potenciais redox, que são redutores no espaço

intracelular e oxidantes no extracelular. Esses lipossomas liberam seu conteúdo quando as pontes dissulfeto presentes nos lipídeos ou em outros componentes são reduzidas pela glutatona a grupos tiol (Bozzuto and Molinari 2015).

Já os lipossomas sensíveis à temperatura são preparados com fosfolipídeos com T_c próximo a 40°C. Dessa forma, ao se esquentar a região na qual os lipossomas foram inseridos, há um aumento da liberação do seu conteúdo (Voinea and Simionescu 2002), o que aumenta a biodisponibilidade da droga localmente, reduzindo sua exposição sistêmica (Bozzuto and Molinari 2015). Esses lipossomas vêm sendo aplicados tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos, e são combinados com diferentes técnicas de indução de calor como ultrassom, micro-ondas e radiofrequência (Dromi, Frenkel et al. 2007, Gasselhuber, Dreher et al. 2010).

2.3.1.3 Lipossomas sítio-específicos e lipossomas carregados

Uma forma promissora de aumentar a especificidade de interação do lipossoma com sua célula alvo é adicionando à sua superfície ligantes que irão reconhecer moléculas específicas. Anticorpos ou outros tipos de ligantes como transferrina (van Rooy, Mastrobattista et al. 2011) e OX26 MAb (anticorpo monoclonal anti-transferrina) (Kang, Jung et al. 2016), irão se ligar a receptores altamente expressos na superfície de células alvos, como as células endoteliais cerebrais, e assim interagir seletivamente com esse tipo celular (Voinea and Simionescu 2002).

O mecanismo e a extensão de interação do lipossoma com as células são bastante influenciados pela carga da superfície do lipossoma. Os lipossomas carregados podem ser tanto catiônicos quanto aniônicos. Os lipossomas carregados apresentam como vantagem a tendência a não formar agregados, devido à presença da carga na sua superfície, e também, a maior interação com as células do organismo (Bozzuto and Molinari 2015).

Os lipossomas catiônicos são muito estudados pelo fato da carga positiva facilitar a interação com a superfície aniônica das células alvos. Uma aplicação importante refere-se a terapia gênica, mediante entrega de complexo

lipossoma/DNA (Bozzuto and Molinari 2015). Porém, o uso dos lipossomas catiônicos é limitado pela sua maior toxicidade.

2.4 Acidente Vascular Encefálico e tratamento

Além do SNC também podemos citar várias outras terapias nas quais se estuda o uso dos lipossomas, como o tratamento de infecções parasitárias como leishmaniose (Azevedo, Ribeiro et al. 2014) e também para tratamento dos diversos tipos de câncer (Frézard, Schettini et al. 2005). Mas essas vesículas têm ganhado bastante destaque nos estudos que focam tratamentos de doenças do SNC, principalmente por sua capacidade de atravessar a BHE e também de promover uma ação mais específica. Os lipossomas são, atualmente, o sistema carreador com mais estudos quando se refere a tratamento de doenças do SNC, representando, nesse sentido, um sistema avançado e com alto potencial de aplicações clínicas (Vieira and Gamarra 2016).

Desordens comuns do SNC como as doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla, tumores cerebrais e AVE são consideradas de grande importância médica. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 1,5 bilhão de pessoas no mundo sofrem de alguma doença de causa neurológica. E é esperado que a prevalência dessas doenças aumente nos próximos anos devido ao aumento da população idosa. Por isso, muitos grupos vêm tentando encontrar formas de se tratar essas doenças, mas, em 2009, de todas as novas terapias desenvolvidas para o SNC somente 8,2% foram aprovadas para uso clínico, sendo o menor valor quando comparado com todas as outras classes terapêuticas (DiMasi, Feldman et al. 2010). E esse insucesso se dá, principalmente, pela presença da BHE (Vieira and Gamarra 2016), e de todos os obstáculos que ela impõe a passagem de substâncias para o tecido cerebral, como já foi discutido anteriormente.

Portanto, é necessário um maior entendimento sobre os mecanismos moleculares dessas doenças e o desenvolvimento de melhores instrumentos de diagnóstico e de tratamento. E, nesse sentido, os lipossomas têm se destacado como carreadores de fármacos para o SNC (Bozzuto and Molinari 2015).

2.4.1 Acidente Vascular Encefálico

O AVE é considerado a segunda causa de morte e a maior causa de incapacidade em adultos no mundo (Luo, Wang et al. 2017). O AVE é uma definição clínica usada para descrever sintomas de distúrbios neurológicos agudos causados por alterações do fluxo sanguíneo cerebral (Feuerstein and Wang 2000). Os sinais e sintomas irão depender da área afetada, podendo ser encontrados vários tipos de acometimento (Valente, 2010), sendo os mais comuns déficits cognitivos e sensório-motores (Brasil, 2013). Os principais fatores de risco do AVE podem ser divididos em 3 grupos: os fatores modificáveis como tabagismo, diabetes mellitus e hipertensão, por exemplo; os fatores não modificáveis, como idade e gênero; e o grupo de risco potencial como sedentarismo e obesidade (Brasil, 2013).

Os AVE's são classificados em duas grandes categorias, AVE isquêmico e AVE hemorrágico figura 4.

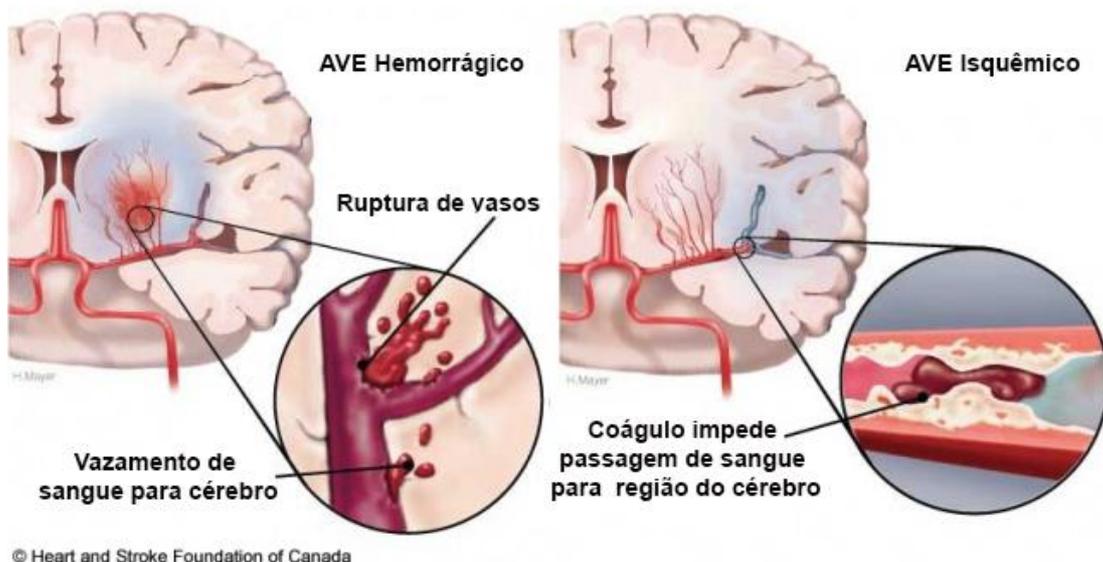


Figura 4: Desenho esquemático do AVE hemorrágico e isquêmico.

O AVE hemorrágico ocorre por rompimento de algum vaso que irriga o encéfalo, sendo esse rompimento causa de enfraquecimento, doença ou trauma na região. O AVE isquêmico ocorre quando algum vaso encefálico é bloqueado por um coágulo o que impossibilita a passagem do sangue e assim a sua chegada à região afetada. Retirado de <http://heart.arizona.edu/heart-health/preventing-stroke/lowering-risks-stroke> em 10 de outubro de 2017.

O AVE isquêmico ou isquemia cerebral, aproximadamente 87% dos casos, é caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo em consequência de uma obstrução nas artérias que irrigam determinada área do cérebro. Essa

obstrução pode ser causada por um trombo (coágulo) ou um êmbolo (Luo, Wang et al. 2017). A oclusão pelo trombo é comumente encontrada nas ramificações das artérias cerebrais, especialmente na artéria carótida interna. Estenose arterial (fluxo sanguíneo turbulento), aterosclerose (formação de placas ulcerosas), e agregação plaquetária são as causas mais comuns de formação de trombos que podem ocluir um vaso ou se desprender virando um êmbolo. E os êmbolos podem chegar, às artérias cerebrais através de vasos extracranianos ou do coração (Rafii and Hillis 2006).

O AVE hemorrágico, menos comum, ocorrendo em aproximadamente 13% dos casos, é dividido em duas formas, o intracranial e o subaracnóide. O AVE hemorrágico intracranial, mais comum, ocorre quando há o rompimento de uma artéria causando extravasamento de sangue para o parênquima cerebral (Mayer and Rincon 2005). Esse rompimento pode ser causado principalmente por hipertensão, malformação de vasos e angiopatia amiloide. Já o extravasamento de sangue subaracnóide, menos comum, normalmente é causado por algum trauma ou ruptura de aneurisma (Rafii and Hillis 2006).

Dados de 2013, mostram que a prevalência do AVE na população mundial foi de 25,7 milhões, sendo que destes, 10,3 milhões de pessoas sofreram AVE pela primeira vez (Benjamin, Blaha et al. 2017). Aproximadamente 5 milhões de pessoas morrem e 6 milhões ficam com sequelas permanentes, o que traz um fardo para a sociedade (Mukherjee and Patil 2011). E em 2013, a somatória dos custos diretos e indiretos com AVE foi de 33,9 bilhões de dólares (Benjamin, Blaha et al. 2017). No Brasil, apesar dos declínios nas taxas de mortalidade, o AVE continua sendo a primeira causa de morte e incapacidade no país. Dados de um estudo nacional indicaram uma incidência de 108 casos por 100 mil habitantes (Brasil, 2013).

2.4.1.1 Fisiopatologia do AVE isquêmico

Como o AVE isquêmico é o mais comumente encontrado entre os pacientes, nossos estudos têm como foco esse tipo de AVE. Os danos causados pela isquemia resultam de uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos que vão se desenvolvendo ao longo do tempo. Sendo que os mecanismos principais dessa cascata de eventos são a excitotoxicidade glutamatérgica, despolarizações na

região próxima ao infarto, inflamação e apoptose celular (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

O tecido cerebral tem alta taxa de consumo de oxigênio e glicose, e depende, principalmente, de fosforilação oxidativa para produção de energia. Com a isquemia, a chegada de oxigênio e glicose é prejudicada e dessa forma a produção de energia para manutenção dos gradientes iônicos das células também (Martin, Lloyd et al. 1994). Sem os gradientes iônicos, o potencial de membrana é perdido e as células neuronais e da glia se despolarizam (Katsura, Kristian et al. 1994). Conseqüentemente, canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tornam-se ativados e neurotransmissores excitatórios, como glutamato, são liberados no espaço extracelular (figura 5). A falta de energia também impede que processos que necessitam dela, como recaptação de neurotransmissores, aconteçam, levando à acúmulos ainda maiores de glutamato extracelular. Por sua vez, a ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) e dos receptores metabotrópicos de glutamato, leva a um aumento ainda maior de Ca^{2+} intracelular (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

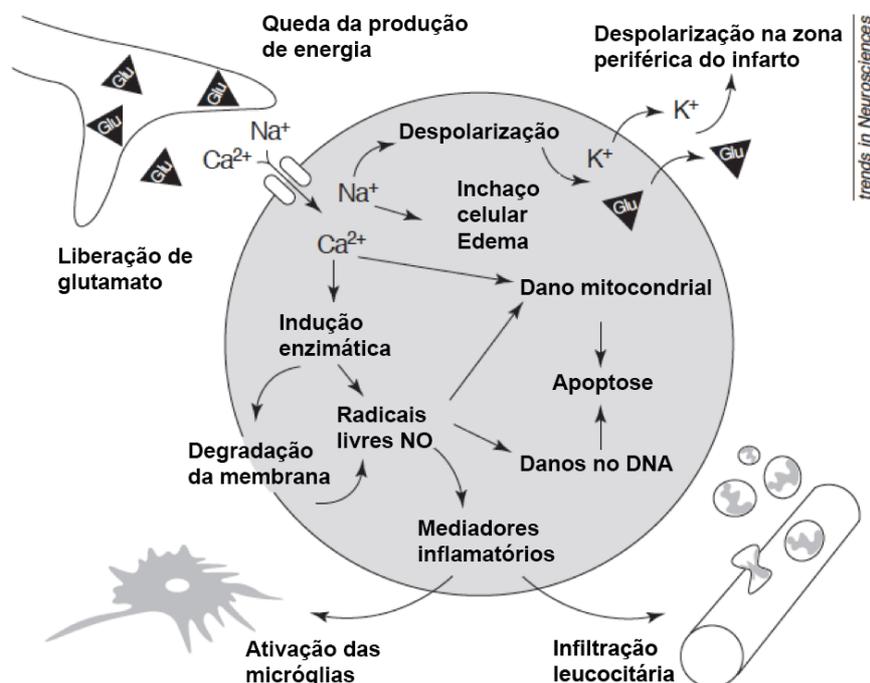


Figura 5: Cascata simplificada de eventos fisiopatológicos que ocorrem na região isquêmica. Os eventos se iniciam com a falta de energia ocasionada pela falta de sangue, mas muitos desses eventos continuam acontecendo e se exacerbam após a reperfusão. Figura obtida com autorização e modificada de (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

O aumento intracelular do segundo mensageiro, cálcio, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que levam a danos teciduais, como ativação de proteínas proteolíticas que degradam o citoesqueleto celular e a matriz extracelular, e também produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Dirnagl, Iadecola et al. 1999). Essas moléculas são importantes sinalizadores que desencadeiam processos como inflamação e apoptose.

O óxido nítrico, um tipo de ROS, produzido nesse caso pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), reage com ânions superóxidos formando substâncias capazes de causar danos celulares e mitocondriais (Beckman and Koppenol 1996, Iadecola 1997).

Todos esses eventos, exemplificados na figura 4, não afetam a região isquêmica de um modo homogêneo. No centro da lesão, onde há redução de até 80% do fluxo sanguíneo (Hossmann 1994), a despolarização acontece minutos após a isquemia e as células morrem rapidamente por lipólise, proteólise, desagregação de microtúbulos seguida de falha bioenergética e alteração drástica da homeostase iônica (Dirnagl, Iadecola et al. 1999). Entre o núcleo da lesão e as células saudáveis não afetadas, está a região de penumbra, na qual o fluxo sanguíneo é reduzido, mas o metabolismo energético ainda é um pouco preservado (Hossmann 1994, Obrenovitch 1995).

Com o passar do tempo e sem tratamento, a área de penumbra pode progredir para uma área infartada com as mesmas características encontradas no centro da lesão. Portanto, o foco das pesquisas, que procuram fármacos capazes de proteger o tecido cerebral contra o AVE, é voltado para a área de penumbra (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

2.4.2 Tratamento farmacológico do AVE isquêmico

Atualmente o único tratamento aprovado para o AVE isquêmico é o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) (Miller, Hartwell et al. 2012), capaz de dissolver o trombo que muitas vezes oclui a artéria, possibilitando assim a recirculação sanguínea para a região afetada (reperfusão). Contudo, devido a sua baixa janela terapêutica e por questões de segurança, como o risco de hemorragia cerebral após tratamento com t-PA, o número de pacientes que realmente pode utilizar esse

medicamento é muito baixo (Adeoye, Hornung et al. 2011). Além disso, mesmo quando o fluxo sanguíneo é reestabelecido, danos secundários causados pela reperfusão podem ser observados no tecido cerebral, principalmente devido à produção de substâncias deletérias, como as espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias (Iadecola and Anrather 2011). Portanto, substâncias candidatas a proteção contra os danos causados tanto na isquemia quanto na reperfusão, têm sido levadas a fases clínicas dos estudos de fármacos. Contudo, nenhuma delas foi aprovada até o momento, e isso se dá principalmente devido a falta de eficácia e efeitos adversos indesejáveis dessas substâncias (Ginsberg 2008, Bae and Sun 2011). Dessa forma, a busca por novas alternativas de tratamento, como os lipossomas, vem sendo testadas na tentativa de aumentar a eficácia do tratamento conseguindo melhores resultados nos testes clínicos (Fukuta, Asai et al. 2016)

A BHE tem a função de manter a homeostase do cérebro, restringindo assim o transporte de moléculas para esse tecido, como já foi discutido anteriormente. Contudo, tem sido mostrado que a permeabilidade da barreira é aumentada durante a fase aguda da isquemia cerebral (Rosenberg and Yang 2007, Zehendner, Librizzi et al. 2011) o que pode facilitar a entrada de substâncias no tecido cerebral (Sifat, Vaidya et al. 2017). Estudos têm mostrado que há entrada e concentração de substâncias na região isquêmica, e que, quando administradas juntamente com lipossomas, a eficácia desses fármacos é aumentada (Luk, Chen et al. 2004, Fukuta, Ishii et al. 2015, Fukuta, Asai et al. 2016).

2.4.2.1 Angiotensina-(1-7) no tratamento do AVE

Dentre as novas possibilidades para tratamento do AVE, a Angiotensina-(1-7), um peptídeo endógeno do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), tem se destacado e seu estudo com foco isquêmico tem se intensificado.

Desde o desenvolvimento do primeiro inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), o captopril, em 1975, o SRA tem sido um dos principais alvos para tratamento de hipertensão e doenças relacionadas. Na visão mais simplista do SRA a conversão de angiotensina I a angiotensina II pela ECA, leva a ativação do receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1R), com indução de vários efeitos que irão

convergir no aumento da pressão arterial. No caso de uma ativação mais prolongada desse receptor há indução de inflamação, fibrose e hipertrofia celular (Bennion, Haltigan et al. 2015).

A hipertensão está intimamente relacionada com o estado fisiológico do sistema cerebrovascular, sendo ela um dos principais fatores de risco para o AVE. Estudos tem mostrado que a utilização de inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1 promove proteção contra AVE (Mecca, O'Connor et al. 2009, Ong, Ong et al. 2013), e que a sinalização através do receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2R) é neuroprotetora em modelos de isquemia e hemorragia cerebral (McCarthy, Vinh et al. 2012, Min, Mogi et al. 2014).

Com isso a visão clássica do SRA foi expandida com a descoberta de uma via alternativa de metabolismo da angiotensina II, na qual esse peptídeo é hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) formando a angiotensina-(1-7), figura 6. Esse heptapeptídeo vai então agir no seu receptor Mas e exercer funções opostas àquelas desencadeadas pela Angiotensina II agindo em AT1R (Santos, Simoes e Silva et al. 2003, Santos, Ferreira et al. 2013, Santos 2014).

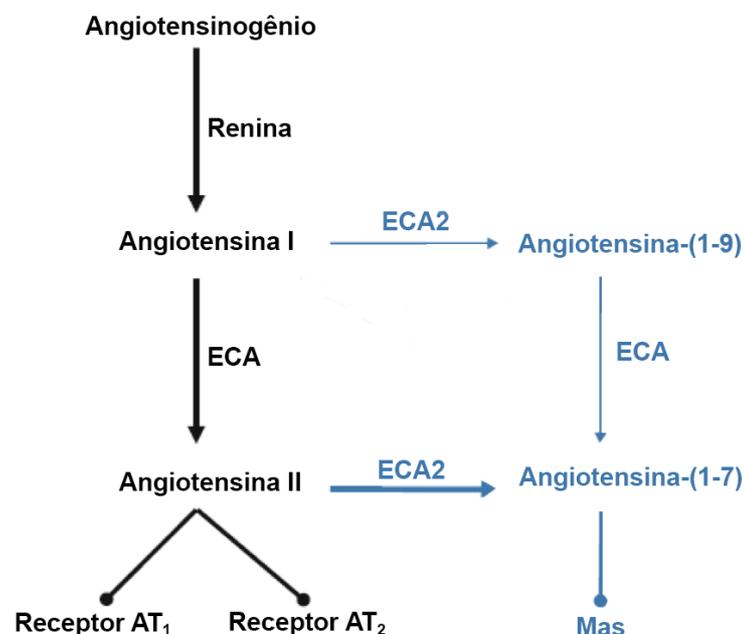


Figura 6: Vias metabólicas dos peptídeos derivados da angiotensina.

A via metabólica que culmina na produção de Ang-(1-7) é uma via endógena e que funciona no organismo de forma homeostática mantendo o equilíbrio entre a produção de Angiotensina I com suas funções hipertensoras e Ang-(1-7) com suas funções protetoras. Obtido com autorização e modificado de (Bader 2013).

Com relação a sua ação no AVE, a Ang-(1-7) vem mostrando características interessantes e promissoras que a tornam um alvo potencial para uso nesse contexto. Primeiro, durante a isquemia cerebral há um aumento da atividade do eixo Ang-(1-7)-Mas (Lu, Jiang et al. 2013), o que permite que tratamentos ajam sinergicamente com mecanismos endógenos (Bennion, Haltigan et al. 2015). E segundo, os efeitos neuroprotetores da Ang-(1-7) em modelos de isquemia e hemorragia cerebral têm apresentado bons resultados (Mecca, Regenhardt et al. 2011, Regenhardt, Bennion et al. 2014, Regenhardt, Mecca et al. 2014).

Mas os efeitos desse heptapeptídeo são de curta duração, uma vez que ele é rapidamente degradado em sistemas *in vivo* (Iusuf, Henning et al. 2008, Jiang, Gao et al. 2013). Por isso, a utilização da Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas pode aumentar a sua eficácia no tratamento da isquemia cerebral.

3 JUSTIFICATIVA

O AVE é uma das maiores causas de morte e incapacidade no Brasil e no mundo. O tratamento efetivo ainda é limitado e basicamente composto por métodos paliativos. Portanto, pesquisas nesta área são de suma importância para que se alcance novas estratégias terapêuticas que visem prevenir e reabilitar indivíduos acometidos por AVE ou àqueles sob o risco.

A estratégia de uso de novos componentes do SRA, principalmente a Angiotensina-(1-7), tem demonstrado efeitos benéficos em modelos animais contra a isquemia cerebral, sugerindo um novo alvo terapêutico para doenças crônicas como AVE. Além disso, a incorporação de fármacos em lipossomas tem mostrado grandes vantagens no tratamento de doenças do SNC, como a potencialização dos efeitos terapêuticos dos fármacos encapsulados e a redução de efeitos adversos.

Fukuta e colaboradores (Fukuta, Asai et al. 2016) mostraram que a utilização dos lipossomas em modelos de isquemia *in vivo* promove um acúmulo do fármaco encapsulado na região isquêmica, além de aumentar a eficácia do tratamento, o que seria uma vantagem para a terapia do AVE.

Portanto, é importante avaliar o perfil de biodistribuição dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) para poder determinar seu tempo de permanência e distribuição no sangue e nos órgãos e em quais situações essas vesículas podem ser úteis. Avaliar também seu comportamento em animais que passaram por isquemia transitória, para assim se estabelecer um sistema nanocarreador potencial para entrega de Ang-(1-7) na região isquêmica.

4 OBJETIVO GERAL

Analisar a distribuição dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) após injeção intravenosa dos mesmos em animais naïve ou submetidos à isquemia cerebral.

4.1 Objetivos específicos

- Produzir lipossomas marcados com a sonda fluorescente Dil com ou sem Ang-(1-7) e realizar a caracterização desses lipossomas em meios diferentes;
- Analisar a cinética plasmática e a distribuição desses lipossomas injetados por via intravenosa, em animais naïve (que não passaram por nenhum procedimento cirúrgico);
- Reproduzir um modelo consistente de isquemia *in vivo*, por meio de cirurgia de oclusão da artéria cerebral média de camundongos;
- Analisar a capacidade dos lipossomas de atingirem a região isquêmica do cérebro de animais submetidos à isquemia.

5 MÉTODOS

5.1 Soluções

Tabela1: Lista das soluções utilizadas nos experimentos

NOME	COMPONENTES (g)
aCSF (líquido cérebro-espinhal artificial) com glicose	H2O destilada Cloreto de Sódio (NaCl) (7,0) Cloreto de Potássio (KCl) (0,15) Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (0,29) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (0,14) Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) (2,18) Fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄) (0,16) Glicose (1,98) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
PBS (tampão fosfato)	H2O destilada Cloreto de sódio (NaCl) (9,0) Na ₂ HPO ₄ (1,09) NaH ₂ PO ₄ (0,32) pH=7,4 ajustado com HCl 1M

5.2 Animais

Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem CD1, com 8-12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água “*ad libitum*” e tiveram temperatura ambiente controlada (25°C), com foto período de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo certificado CEUA-UFMG nº 327/2015.

5.3 Preparo de lipossomas

Para o preparo dos lipossomas foram utilizados os lipídeos diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), colesterol (CHOL), diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol 2000 (DSPE-PEG2000) na proporção molar de 10:5:1, respectivamente e foi incorporada a sonda fluorescente lipofílica derivada da carbocianina, Dil (1,1'dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato, Molecular Probe, EUA), na concentração de 2,5mol% de DSPC, para o estudo de

farmacocinética e de biodistribuição dos lipossomas no animal. A concentração final de lipídeos para os lipossomas vazios foi de 90mM. Para tal preparo utilizamos o método de congelamento-descongelamento (Mayer, Hope et al. 1985), seguido de extrusão (Nayar, Hope et al. 1989). Sucintamente, os lipídeos citados acima e o marcador Dil, foram solubilizados em clorofórmio em um balão de fundo redondo que posteriormente foi levado ao rotavapor (banho à 60°C) para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Este, foi hidratado com solução de PBS (NaCl 0,15M, fosfato 0,01 M, pH 7,4) por 1 hora à 60°C e passou, logo em seguida, por 5 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido por tempo necessário para que houvesse completo congelamento da dispersão) e descongelamento (banho à 65°C por tempo necessário para que a dispersão descongelasse completamente). Visando calibrar o tamanho dos lipossomas, a dispersão de vesículas multilamelares foi submetida ao processo de extrusão, que consiste em filtração repetida a 65°C, através de membrana de policarbonato com poro de 200nm (5 vezes) seguida de nova extrusão pela membrana de 100nm (5 vezes), usando uma extrusora.

5.4 Preparo dos lipossomas com Angiotensina-(1-7)

Também foram preparados lipossomas marcados com a sonda fluorescente Dil e que continham em seu interior Ang-(1-7) usando o método de desidratação rehidratação (Kirby and Gregoriadis 1984, Silva-Barcellos, Frezard et al. 2001). Os lipossomas passaram pelas mesmas etapas iniciais de preparo citadas acima e ao final da extrusão, a dispersão de lipossomas (1mL) foi misturada com solução de Ang-(1-7) (1mL contendo 3mg/L em NaCl 0,03M) e a mistura foi liofilizada. A amostra liofilizada foi então resuspendida em 0,2mL de água Mili-Q e incubada por 30 min à 55°C com agitação constante, em seguida foram adicionados 0,2mL de PBS e novamente a dispersão foi incubada por 30 min à 55°C. Posteriormente, a amostra foi diluída com mais 1,4mL de PBS e extrusada em membrana de 100nm. A Ang-(1-7) não encapsulada foi retirada através de diálise em PBS à 4°C por 24h, com agitação constante. Para os lipossomas com Ang-(1-7) a concentração final de lipídeos foi de 50mM.

A figura 7 exemplifica todo o processo de produção dos lipossomas vazios (primeira linha) e dos lipossomas encapsulados com Ang-(1-7).

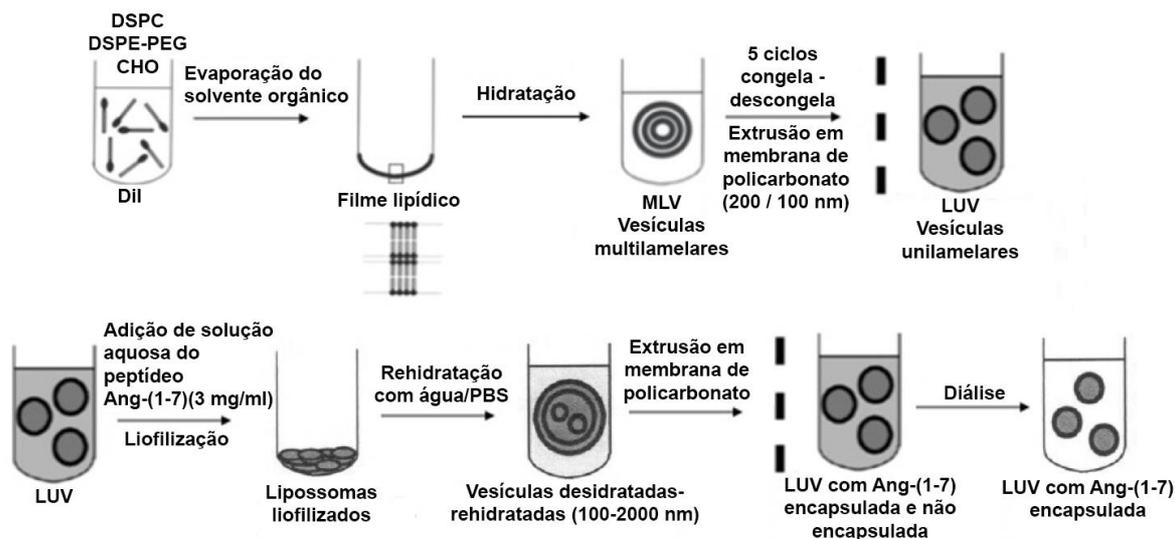


Figura 7: Esquema síntese de lipossomas.

Na primeira linha está representada a síntese de lipossomas vazios e a continuação na segunda linha indica a segunda parte da produção de lipossomas encapsulados com Ang-(1-7). Obtido e modificado com autorização de (Frezard, dos Santos et al. 2011).

5.5 Caracterização dos lipossomas

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas, o índice de polidispersão (PDI), e o potencial Zeta (carga) dos lipossomas tanto vazios quanto com Ang-(1-7) encapsulada, foram determinados usando o equipamento Zetasizer (Nano – ZS90, Malvern).

Para realização dessas medidas, em cubeta apropriada, 20 μ L da dispersão de lipossomas [vazio ou com Ang-(1-7)] foram diluídos em 2mL de solução de PBS ou de aCSF (líquido cefalorraquidiano artificial). A solução diluída foi levada ao equipamento, onde as leituras foram obtidas a 25°C.

Para determinar a taxa de encapsulação da Ang-(1-7) nos lipossomas, foi utilizado o método de quantificação validado por Silva-Barcellos e colaboradores (Silva-Barcellos, Frezard et al. 2001), que explora a fluorescência intrínseca do peptídeo. Em espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Varian), foi registrada a intensidade de fluorescência (excitação em 280 nm; emissão em 305 nm) do peptídeo em 2mL de metanol acrescentado de 50 μ L de “lipossomas brancos” [sem Ang-(1-7)]. Foi construída uma curva de calibração variando a concentração, do peptídeo de 0,024 a 0,0309 mg/mL, na qual verificou-se a linearidade da relação da fluorescência com a concentração. Em seguida, foi feita leitura da dispersão de lipossomas com Ang-

(1-7) antes da diálise (100%) e depois da diálise. Os lipossomas utilizados para esse experimento não estavam marcados com o Dil, uma vez que o objetivo era detectar a fluorescência intrínseca da Ang-(1-7) e a fluorescência do marcador iria interferir nessa quantificação. Através dos valores obtidos foi possível determinar as concentrações de Ang-(1-7) em cada situação e assim obter a taxa de encapsulação (TE), que foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ TE} = \frac{\text{Concentração de Ang-(1-7) nos lipossomas}}{\text{Concentração Total de Ang-(1-7)}} \times 100$$

Sendo TE a taxa de encapsulação, Concentração de Ang-(1-7) nos lipossomas o valor obtido com a amostra após a diálise, e Concentração total o valor obtido com a amostra antes da diálise.

5.6 Cirurgia de isquemia (oclusão da artéria cerebral média)

O procedimento cirúrgico utilizado para a indução da isquemia foi baseado na modificação do método descrito por Longa e colaboradores para a oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM) (Longa, Weinstein et al. 1989). A anestesia foi induzida pela inalação de 4% Isoflurano (em O₂) e mantida pela inalação de 1.5 - 2% de Isoflurano. Para realização da cirurgia, o animal foi colocado na posição supina na mesa cirúrgica, suas patas anteriores foram imobilizadas, os pelos da região anterior do pescoço foram retirados e em seguida foi realizada a assepsia dessa região com álcool 70 e álcool iodado. Foi realizada uma pequena incisão sagital mediana na pele e os tecidos foram divulsionados até que a artéria carótida comum (ACC) direita, assim como, a bifurcação em artéria carótida externa (ACE) e artéria carótida interna (ACI) pudessem ser visualizadas. A ACC foi ocluída com um microclipe e a ACE foi ligada com um fio de seda em sua porção distal da bifurcação com a ACI. Em seguida, a ACE foi eletrocauterizada na sua porção distal e um novo fio de seda foi utilizado para realização de um segundo nó na ACE. Posteriormente, o ramo da artéria carótida interna (ACI), pterigopalatino, e a ACI foram temporariamente ocluídos com um microclipe cirúrgico. A ACE foi parcialmente seccionada e o fio de oclusão (MCAo suture 602356PK10/602256PK10, Doccoll Corporation, EUA) introduzido em direção a ACI até o local em que se encontrava o microclipe. Esse microclipe foi então

rapidamente retirado e o fio de oclusão continuou a ser introduzido através da ACI até a origem da Artéria cerebral Média (ACM) direita, ocluindo assim a irrigação sanguínea do território correspondente pelo período estabelecido. A figura 8 ilustra o caminho do fio de oclusão até a origem da artéria cerebral média.

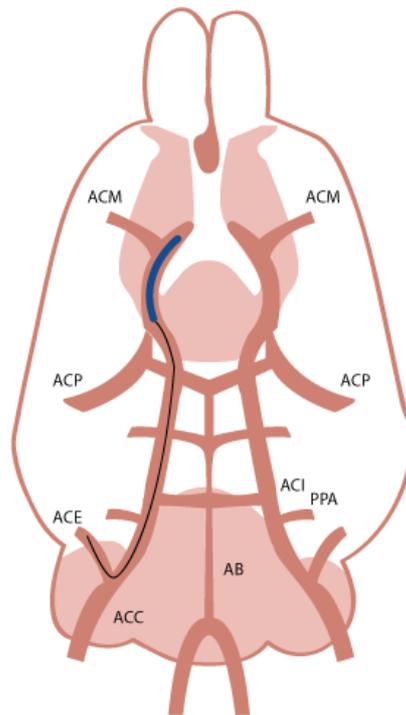


Figura 8: Ilustração da cirurgia de oclusão da artéria cerebral média.

ACC: artéria carótida comum. ACE: artéria carótida externa. ACI: artéria carótida interna. AB: artéria basilar. PPA: artéria pterigopalatina. ACP: artéria cerebral posterior. ACM: artéria cerebral média.

Foram utilizados dois critérios para determinar se o fio de oclusão estava na origem da ACM: a inserção do fio a uma distância de 10 - 11mm da bifurcação da ACC e/ou quando ocorria uma discreta resistência à passagem do fio nessa distância. O fio de oclusão foi mantido nessa posição através de uma ligadura à parede da ACE. O animal foi suturado, retirado do aparato anestésico e levado para um aparelho de Laser Doppler (moorLDI2-HIR, moor Instruments) com a finalidade de se verificar a redução do fluxo sanguíneo e estabelecimento da isquemia. Em seguida, eles foram encaminhados para uma gaiola de recuperação. Durante o período da isquemia, os animais foram mantidos acordados, aquecidos e hidratados com 1 mL de salina intraperitonealmente. Após os 60 minutos de isquemia, o animal foi reanestesiado e o fio de oclusão retirado, dando início a reperfusão. Imediatamente após a sutura do animal, solução salina, lipossoma vazio (90mM) ou lipossoma com Ang-(1-7) (50mM) foram injetados na veia da cauda dos animais.

Animais sham passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a efetiva oclusão da artéria. E esses animais também receberam salina, lipossoma vazio ou lipossoma com Ang-(1-7) intravenoso.

5.7 Cuidados pós-operatórios

Após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos em uma mesa de recuperação por cerca de duas horas para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C e receberam mais 1 mL de salina e o analgésico Tramadol (5mg/Kg). Doze horas após a cirurgia, os animais foram pesados e receberam novamente solução salina e Tramadol. Também foram monitorados quaisquer efeitos adversos. Água e ração umedecida foram disponibilizadas no fundo da gaiola para facilitar o acesso. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 24 horas após o fim da cirurgia. Os camundongos foram eutanasiados 24h após a cirurgia para coleta dos cérebros, que foram então levados para aquisição de imagens fluorescentes.

5.8 Imagens In Vivo Xtreme

Após 24h da injeção intravenosa, os cérebros dos animais foram removidos, seccionados em fatias de 2mm de espessura e levados ao sistema de detecção de fluorescência, In Vivo Xtreme (Bruker), onde imagens foram coletadas para detecção da fluorescência presente nos lipossomas (sonda Dil, excitação 549, emissão 565).

A figura 9 mostra o delineamento experimental dos animais que passaram por cirurgia de isquemia e dos animais sham.

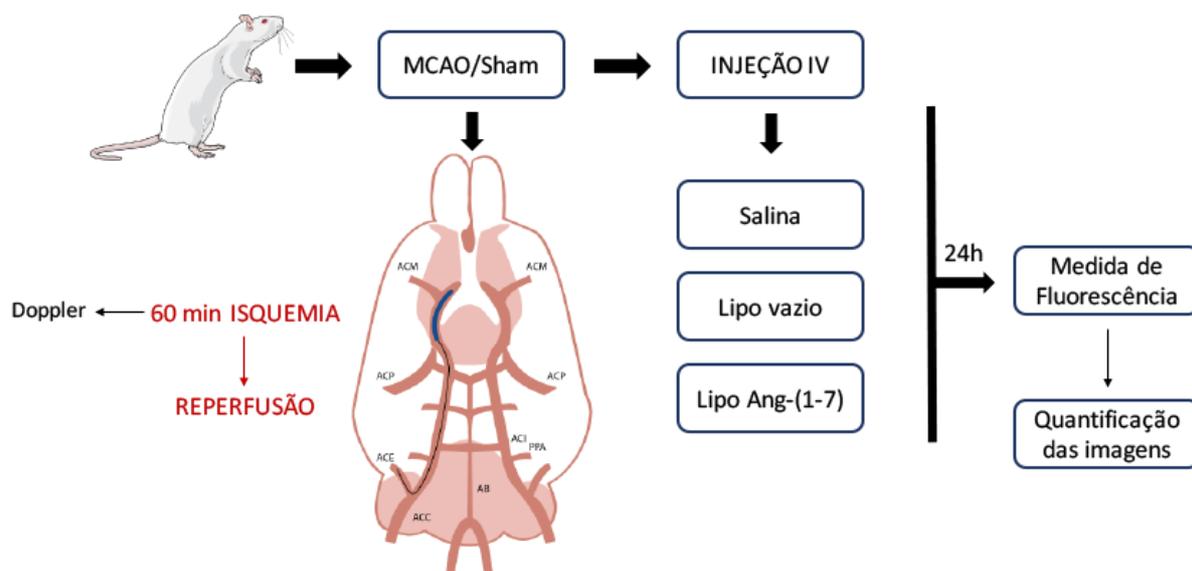


Figura 9: Delineamento experimental dos animais que passaram por cirurgia MCAo ou Sham.

5.9 Biodistribuição e cinética dos lipossomas no plasma de animais naïve

Para realização da biodistribuição e cinética dos lipossomas vazios e lipossomas com Ang-(1-7) nos camundongos CD1, a dispersão de lipossomas marcados com Dil [vazio ou com Ang-(1-7)] ou somente solução salina (grupo controle) foi administrada por via intravenosa. Após 1 hora e meia, 4 horas e 24 horas, os animais foram anestesiados com quetamina:xilazina (150:75 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 6,67 $\mu\text{L}/\text{g}$) e perfundidos pelo ventrículo esquerdo do coração, com 20mL de solução salina. Após a perfusão, os órgãos (cérebro, baço, rim, pulmão, fígado) foram retirados e levados para imagem no In Vivo Xtreme. Para a análise da distribuição, foram feitas imagens ventrais e dorsais dos órgãos, sendo considerada para quantificação da fluorescência a média da fluorescência dos dois lados do órgão.

No estudo da cinética dos lipossomas no plasma, as formulações (lipossomas marcados com Dil, sem ou com Ang-(1-7); ou salina como grupo controle) foram administradas por via intravenosa. Após 1 hora e meia, 4 horas e 24 horas os animais foram anestesiados e o sangue foi retirado por punção cardíaca, pelo ventrículo esquerdo. As amostras de sangue foram centrifugadas (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) a 3000 RPM por 20 minutos. O plasma foi recolhido e as leituras da fluorescência foram feitas nos diferentes tempos, usando In Vivo Xtreme.

A quantificação da fluorescência foi feita no programa do equipamento (Bruker, Multispectral Imaging).

A figura a seguir mostra o delineamento experimental da biodistribuição e farmacocinética dos animais.

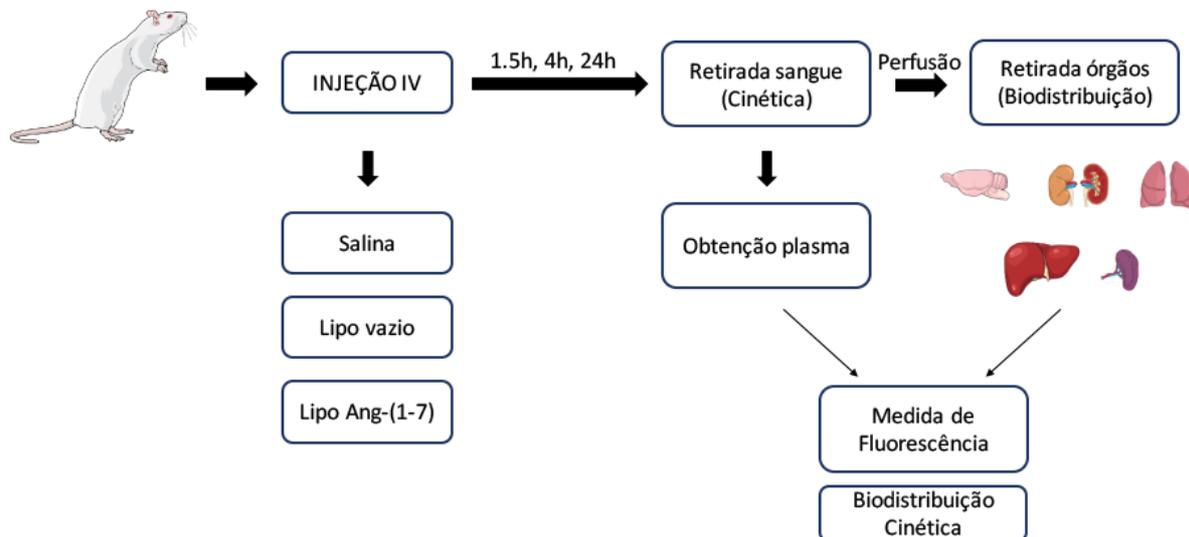


Figura 10: Delineamento experimental da biodistribuição e cinética dos lipossomas no plasma.

5.10 Análises estatísticas

A distribuição das amostras foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Testes estatísticos específicos foram utilizados para análise dos resultados. Para a caracterização dos lipossomas foi utilizado o teste *t* de Student. Para a cinética foi utilizado o teste One-way ANOVA, pos hoc Tukey. Para a quantificação dos lipossomas nos cérebros isquemiados e sham foi usado o teste Two-way ANOVA, pos hoc Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm DPM para as variáveis de distribuição normal. Os resultados foram considerados significativos quando alcançaram nível $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7)

A caracterização de tamanho e de potencial zeta dos lipossomas foi feita tanto em PBS, solução na qual os lipossomas foram preparados, quanto em aCSF com glicose, solução que mimetiza o líquido cefalorraquidiano. É importante a realização dessa caracterização também em aCSF, uma vez que, tendo como objetivo fazer uma dispersão para ser utilizada no SNC, a composição deste líquido poderia influenciar nas características dos lipossomas. Todos os resultados estão expressos na figura 11 e na tabela 2.

Tabela 2: Características dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) em PBS e em aCSF

Amostra	Meio de diluição	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Lipo vazio	PBS	121,1±6,89	0,076±0,044	- 1,108±0,71
Lipo vazio	aCSF	118,7±12,30	0,077±0,042	- 0,807±2,08
Lipo Ang-(1-7)	PBS	122,5±10,12	0,029±0,023	- 1,072±0,87
Lipo Ang-(1-7)	aCSF	128,5±2,55	0,023±0,017	- 2,775±2,99

Como pode ser observado no gráfico e na tabela acima os diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas se encontram na mesma faixa, tanto em PBS quanto em aCSF, um pouco acima de 100nm. Este valor é condizente com o poro de 100 nm da membrana de policarbonato, usada no processo de extrusão. O índice de polidispersão (PDI) foi abaixo de 0,1 para todas as formulações, o que evidencia populações de vesículas monodispersas em tamanho. Já o potencial zeta indica uma carga superficial próxima da neutralidade, explicada pela camada superficial eletricamente neutra formada pelo polímero de etileno glicol.

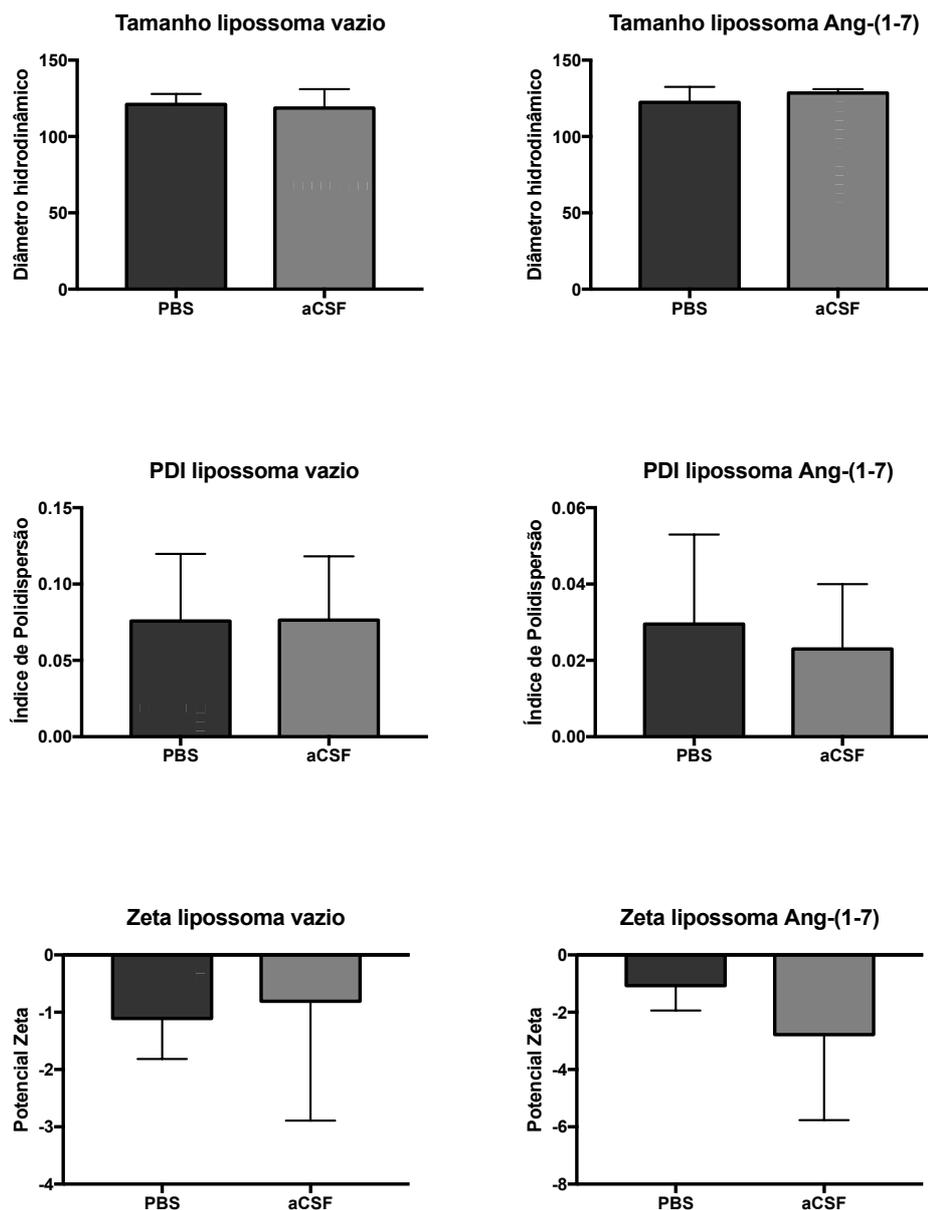


Figura 11: Valores da caracterização dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) em PBS e em aCSF.

Os parâmetros analisados foram diâmetro hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta. Os gráficos mostram os valores de cada parâmetro em PBS e em aCSF com glicose. São mostrados os dados com média \pm DPM (N = 6 para valores em PBS e N = 3 para valores em aCSF). Teste t-Student, $p > 0,05$.

Em todos os casos, os lipossomas mostram as mesmas características no PBS e no aCSF, o que indica que o aCSF não é capaz de alterar as características dessas nanopartículas.

A figura 12 mostra a curva padrão com concentrações crescentes de Ang-(1-7) (0,0024 a 0,0309 mg/mL), sendo o eixo y valores de intensidade de fluorescência e o eixo x as concentrações de Ang-(1-7).

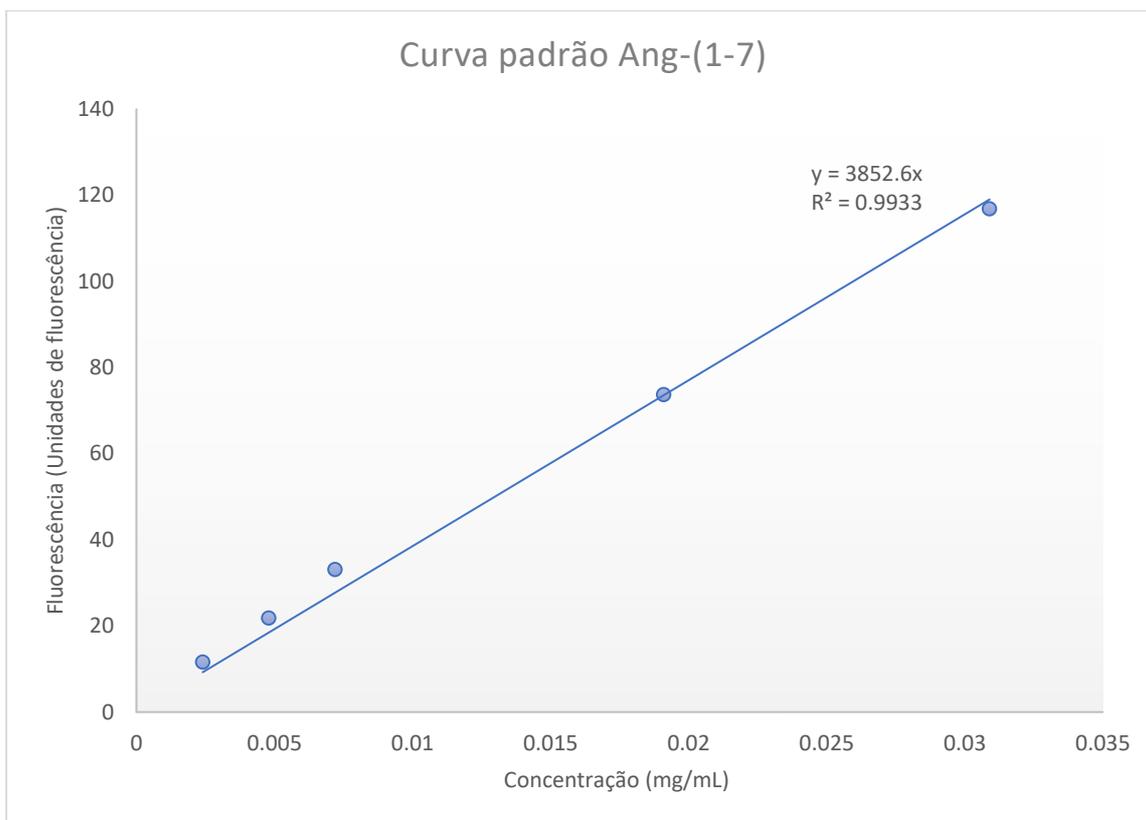


Figura 12: Curva padrão de Ang-(1-7) em metanol.

No eixo y estão plotados os valores de intensidade de fluorescência (excitação 280 nm, emissão 305 nm) e no eixo x as concentrações de Ang-(1-7).

Após a realização da curva, foram feitas as leituras das amostras, em espectrofluorímetro, de lipossomas com Ang-(1-7) antes e após a diálise. Usando a equação da curva $y = 3852,6x$ foi possível obter os valores das concentrações referentes a cada amostra e, a partir disso, calcular a taxa de encapsulação, pela equação já citada nos métodos. Dessa forma, os valores obtidos para a taxa de encapsulação e a concentração de Ang-(1-7) dentro dos lipossomas foram os seguintes: taxa de encapsulação de 5,7% e concentração de Ang-(1-7) de 0,0016 mg/mL.

6.2 Biodistribuição dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7)

Para se estudar a biodistribuição, ou seja, a passagem de partículas do sangue para os órgãos, 4 camundongos CD1 receberam injeção intravenosa de lipossomas vazios ou de lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil. A figura 13

ilustra essa biodistribuição pelos órgãos de animais que receberam lipossomas vazios.

Na figura 13 podemos observar o perfil de distribuição dos lipossomas vazios entre os principais órgãos do metabolismo (fígado e baço) e de excreção (rim), além de outros órgãos também importantes (pulmão) e de interesse (cérebro).

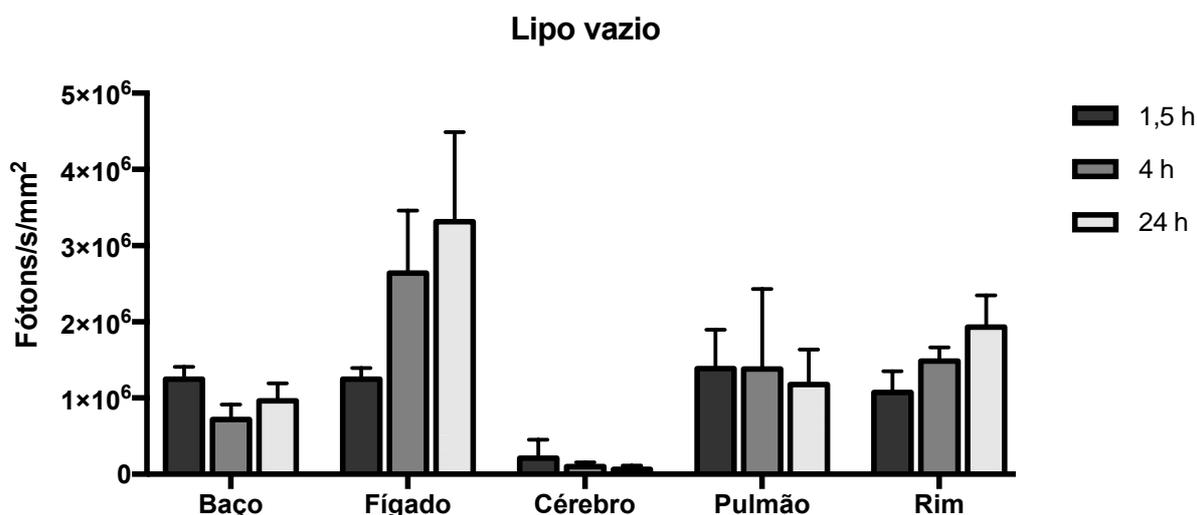


Figura 13: Perfil de biodistribuição da fluorescência entre os órgãos de camundongos em diferentes tempos após administração dos lipossomas vazios marcados com DiI. O gráfico mostra os valores nos tempos de 1,5h, 4h e 24h após a administração intravenosa das vesículas para os cinco órgãos escolhidos. N = 4 para cada tempo. São mostrados os dados com média \pm DPM.

A unidade utilizada fótons/seg/mm² é uma unidade obtida no equipamento onde foram feitas as análises (In Vivo Xtreme), que indica de forma indireta, a quantidade de fluorescência detectada em cada situação, sendo uma indicativa da quantidade de lipossomas que chegou em cada órgão ao longo do tempo. Todos os órgãos tiveram seus valores de intensidade de fluorescência (fótons/seg/mm²) normalizados pela área do órgão (feito pelo próprio equipamento automaticamente), e os dados plotados no gráfico são os valores normalizados dos grupos que receberam lipossomas, descontados dos valores normalizados do grupo que só recebeu solução salina. Os dados são semi-quantitativos (Tansi, Ruger et al. 2017), tanto da biodistribuição dos lipossomas vazios quanto dos lipossomas com Ang-(1-7) e, portanto, são mostrados nos gráficos o perfil da distribuição dos lipossomas ao longo do tempo para cada órgão.

De um modo geral é possível observar o aumento do sinal no baço, um órgão importante no metabolismo de lipossomas. Além disso, há um aumento crescente na quantidade de lipossomas no fígado ao longo de tempo, outro órgão importante no metabolismo de uma forma geral. No pulmão a fluorescência se manteve a níveis parecidos durante os três momentos. E no rim houve também um aumento crescente da quantidade de fluorescência ao longo do tempo.

Além disso, ainda é possível observar uma quantidade considerável de fluorescência detectada no cérebro, indicando que os lipossomas foram capazes de atravessar a BHE intacta e chegar ao tecido cerebral.

Essas mesmas análises também foram feitas com o lipossoma com Ang-(1-7) e a Figura 14 mostra esses resultados.

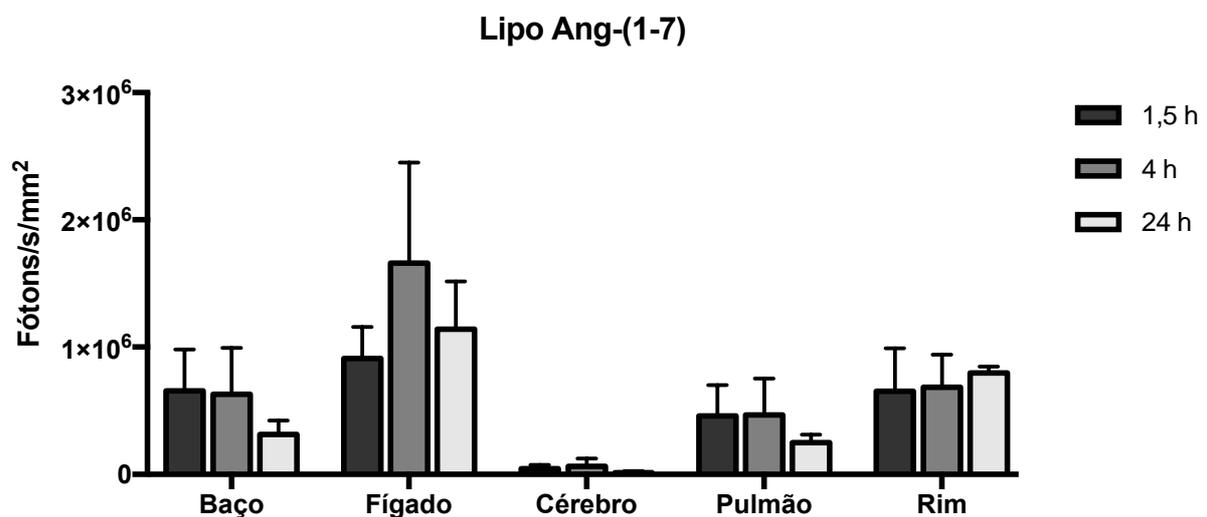


Figura 14: Perfil de biodistribuição da fluorescência entre os órgãos de camundongos em diferentes tempos após administração dos lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil. O gráfico mostra os valores nos tempos de 1,5h, 4h e 24h após a administração intravenosa das vesículas para os cinco órgãos escolhidos. N=4 para cada tempo. São mostrados os dados com média ± DPM.

Podemos observar pelo gráfico acima, que o sinal do fígado mais uma vez foi maior que os dos outros órgãos. Os valores para o baço se mantiveram constante ao longo das 4 horas reduzindo depois de 24 horas, o que também aconteceu no pulmão. E nos rins a quantidade de fluorescência se manteve constante ao longo do tempo.

E também com os lipossomas contendo Ang-(1-7) foi possível detectar sinal no cérebro, um indicativo da presença dos lipossomas nesse tecido.

6.3 Cinética plasmática dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7) em animais naïve

A figura 15 mostra o resultado das imagens do plasma dos animais naïve que receberam lipossomas vazios e com Ang-(1-7) feitas no In Vivo Xtreme. É possível observar o perfil da cinética dos lipossomas vazios e com Ang-(1-7), 1,5h, 4h e 24h depois da administração.

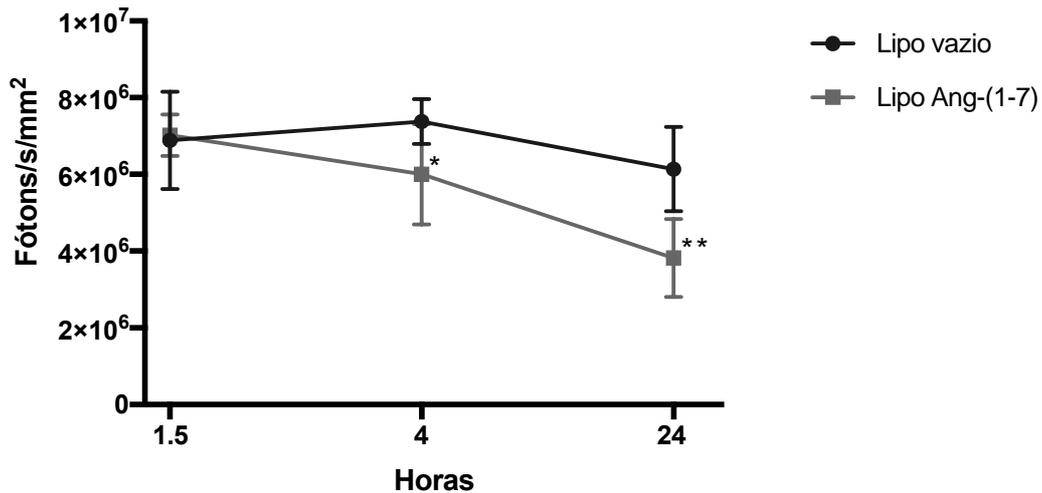


Figura 15: Cinética plasmática dos lipossomas contendo ou não Ang-(1-7) marcados com Dil em tempos diferentes.

O gráfico mostra o perfil 1,5h, 4h e 24h após a administração de lipossomas vazios e de lipossomas com Ang-(1-7) em camundongos. Os valores são referentes à quantidade de fluorescência detectada pelo equipamento In Vivo Xtreme. One-way ANOVA, post-hoc Tukey, $p < 0,05$ *, diferença entre 4 e 24 horas, e $p < 0,01$ ** diferença entre 1,5 e 24 horas. $N = 4$ para cada tempo. São mostrados os dados com média \pm DPM.

A quantidade de fluorescência detectada no grupo lipossoma vazio continuou a mesma ao longo do tempo, não apresentando diferenças significativas entre os valores ($22,72 \pm 4,04$; $23,55 \pm 1,65$; $19,89 \pm 3,11$; valores para 1,5h, 4h e 24h respectivamente). Enquanto a quantidade de fluorescência detectada no grupo lipossoma Ang-(1-7) foi diminuindo ao longo do tempo, sendo o valor de 24 horas ($13 \pm 3,49$, $p < 0,01$) menor que o de 1,5 horas ($22,91 \pm 1,29$, $p < 0,01$) e o de 4 horas ($19,67 \pm 4,47$, $p < 0,05$).

6.4 Distribuição dos lipossomas na região isquêmica

Os animais que passaram pela cirurgia de MCAo (grupo isquemiados) quanto do grupo sham foram levados ao equipamento Laser Doppler para análise da

quantidade de fluxo sanguíneo nos dois hemisférios, a fim de se confirmar ou não a ocorrência da isquemia.

A figura 16A mostra imagens representativas da intensidade do fluxo sanguíneo medida pelo Laser Doppler, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E), e também uma foto do animal com o crânio exposto para realização da análise. O gráfico da figura 16B mostra o resultado da quantificação do fluxo sanguíneo, expresso como a razão entre o valor médio da intensidade na região isquêmica do lado direito e o valor médio da intensidade na região contralateral à região isquêmica.

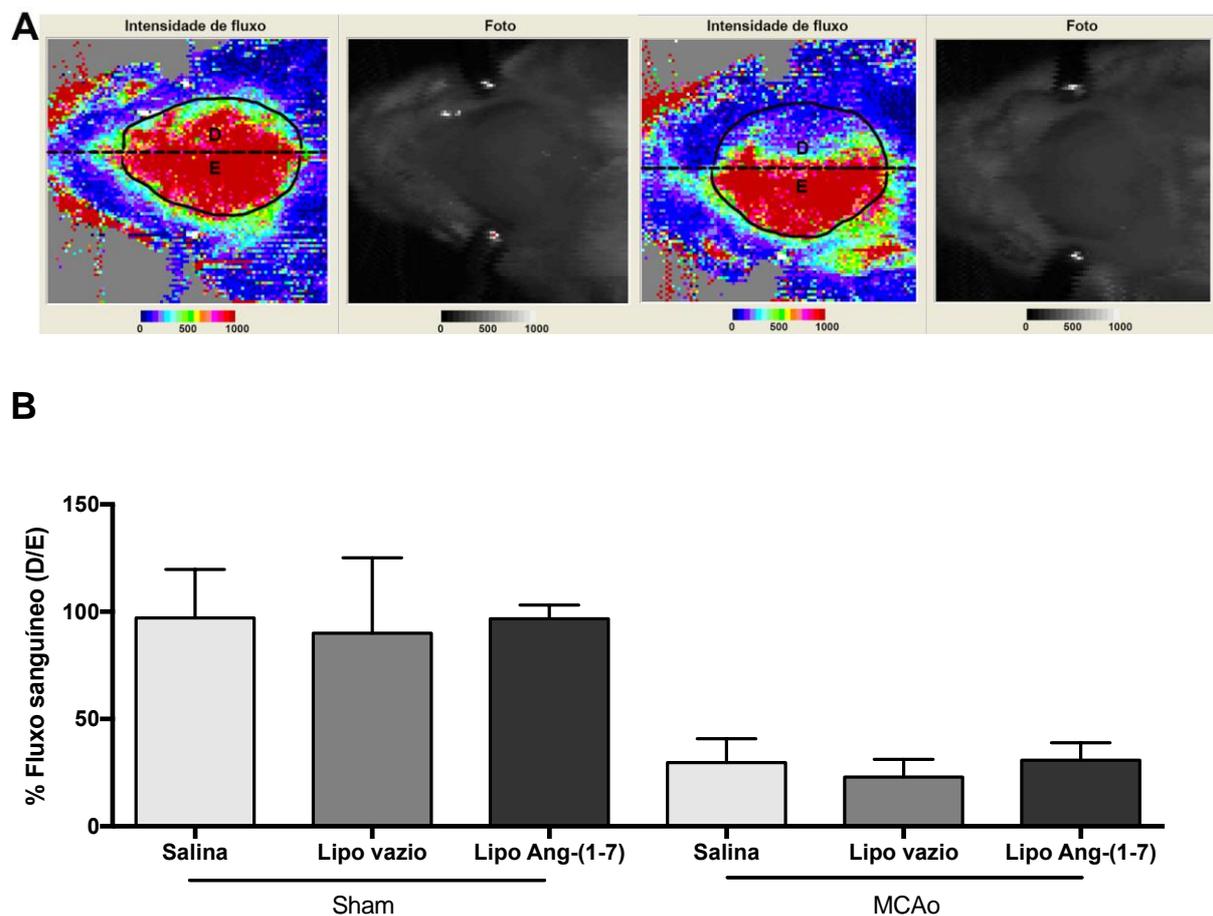


Figura 16: Porcentagem do fluxo sanguíneo nos animais sham e MCAo durante o período de isquemia.

As imagens em A representam a intensidade de fluxo sanguíneo no hemisfério direito (D) e esquerdo (E) durante a isquemia em camundongos sham (figura da direita) e camundongos MCAo (figura da esquerda). E o gráfico B representa a quantificação das imagens dos grupos de animais Sham e MCAo. N = 3 para grupos sham e 7 para grupos MCAo. São mostrados os dados com média \pm DPM.

Como é possível observar pela figura 16, os animais Sham não apresentaram redução significativa de fluxo sanguíneo durante o período da cirurgia [salina $97,11 \pm 22,61$; lipo vazio $89,99 \pm 35,1$; lipo Ang-(1-7) $96,65 \pm 6,35$]. Já os animais MCAo apresentaram uma média de 30% de fluxo sanguíneo durante a isquemia [salina $29,63 \pm 11,2$; lipo vazio $22,92 \pm 8,31$; lipo Ang-(1-7) $30,8 \pm 8,09$]. Isso mostra uma redução de aproximadamente 70% do fluxo sanguíneo, decorrente da oclusão da artéria cerebral média, confirmando a ocorrência de isquemia no grupo MCAo e, portanto, o sucesso na realização do modelo de isquemia *in vivo*.

Após a realização da cirurgia, como já citado anteriormente, os animais foram injetados via intravenosa com solução salina, lipossomas vazios e lipossomas com Ang-(1-7). Para analisar o acúmulo dos lipossomas os animais MCAo e Sham tiveram seu cérebro retirado para imagem 24h depois da injeção.

A figura 17 mostra imagens representativas dos cérebros de animais do grupo Sham e MCAo que receberam lipossomas vazios.

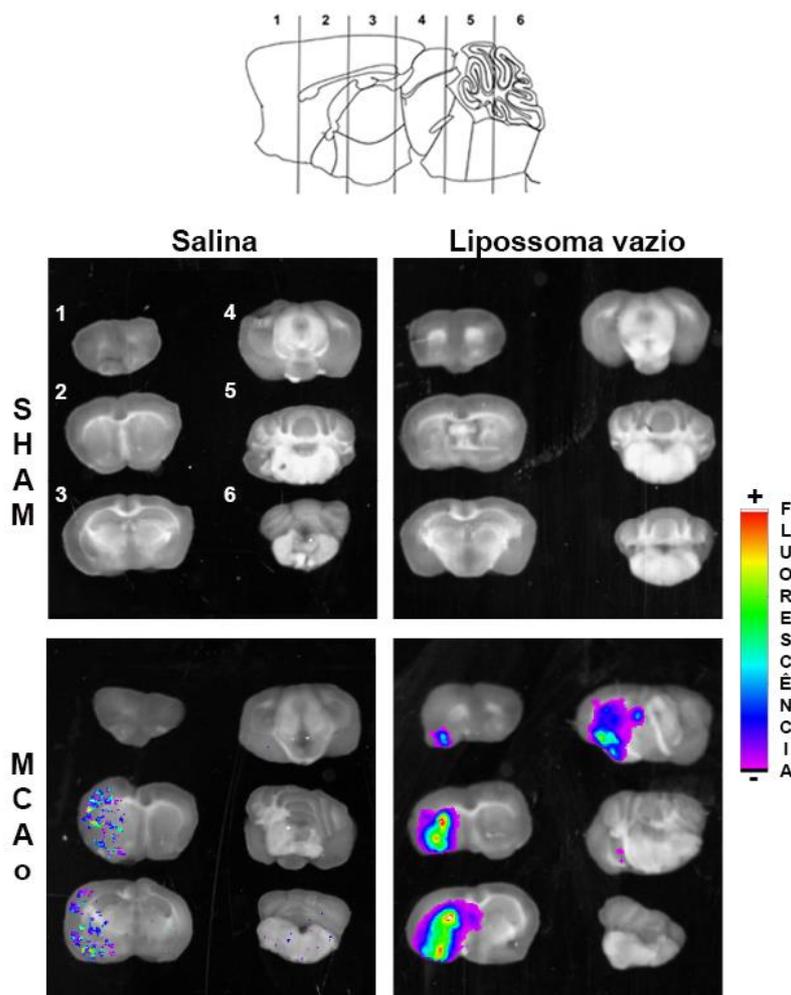


Figura 17: Imagens In Vivo Xtreme do cérebro de camundongos após administração de lipossomas vazios marcados com Dil.

A figura mostra imagens representativas do In Vivo Xtreme de 6 fatias do cérebro de animais Sham e animais MCAo que receberam salina ou uma dose de lipossomas vazios marcados com Dil por via intravenosa. A primeira fatia corresponde ao número 1, a segunda ao número 2, e assim sucessivamente como indicado no desenho esquemático do cérebro acima das imagens do In Vivo Xtreme.

As imagens acima representam 6 fatias de 2mm do cérebro de um animal. Dessa forma, a primeira fatia (1) como indicado na figura corresponde à região do córtex pré-frontal com o início do estriado. A segunda fatia (2) corresponde à região do estriado e início do hipocampo. A terceira fatia (3) indica o hipocampo ventral e final do dorsal. A quarta fatia (4) pega o hipocampo dorsal e o tálamo. A quinta (5) e sexta fatias (6) mostram o cerebelo, e como essas fatias já não apresentam tecido cerebral nas análises semi-quantitativas realizadas elas não foram utilizadas.

Na figura 17 é possível perceber que foi detectada fluorescência no cérebro, o que é indicativo da presença de lipossomas. Nos animais Sham a intensidade de

fluorescência é menor do que quando comparada com o grupo MCAo de modo que não é possível observar na imagem. Já nos animais MCAo a fluorescência se concentra no hemisfério direito, aquele que sofreu dano isquêmico. Também é possível observar que nos animais isquêmicos do grupo salina há um pouco de autofluorescência também do lado direito que sofreu isquemia.

A figura 18 mostra a análise semi-quantitativa da fluorescência nas fatias de cérebro dos animais que passaram por cirurgia Sham e MCAo e que receberam lipossomas vazios (imagens da figura 17). Foi calculada a razão entre as médias de fluorescência das primeiras 4 fatias do hemisfério direito e as respectivas fluorescências do hemisfério esquerdo do cérebro dos animais, como indicado na figura, e o valor da quantificação de cada fatia foi plotado separadamente no gráfico.

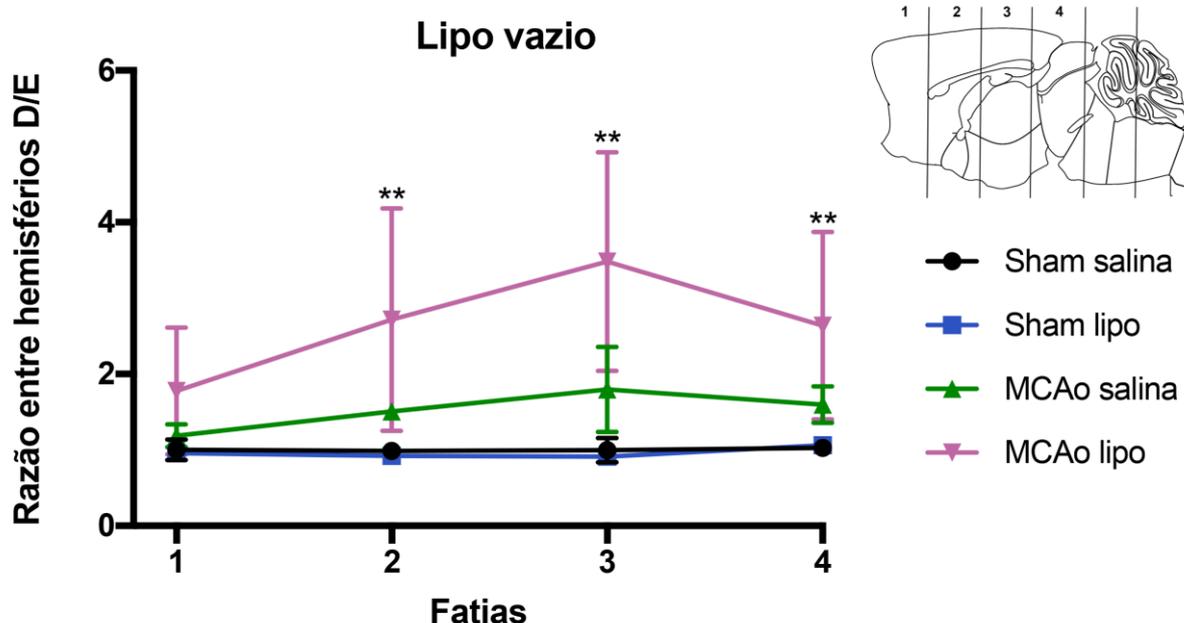


Figura 18: Análise semi-quantitativa da fluorescência no hemisfério direito em comparação com o esquerdo em camundongos que receberam lipossomas vazios marcados com Dil.

A figura mostra a razão dos valores de fluorescência do hemisfério direito (isquemiados) pelo hemisfério esquerdo, para as 4 primeiras fatias do cérebro, como indicado no desenho esquemático. O ** indica que o valor do grupo MCAo lipo é diferente dos grupos Sham (salina e lipo) e do grupo MCAo salina. São mostrados os dados com média \pm DPM. Two way ANOVA, post-hoc Tukey, diferença intergrupos $p < 0,01$ **. N = 4 para cada grupo.

No gráfico da figura 18 é possível observar que a relação entre os hemisférios direito e esquerdo dos animais Sham lipo vazio é igual a 1 ($0,96 \pm 0,05$; $0,92 \pm 0,03$; $0,91 \pm 0,02$; $1,06 \pm 0,01$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente) o que

sugere que não há diferença entre a quantidade de lipossomas nos dois hemisférios, em todas as fatias. O que já era esperado uma vez que nesses animais não há ocorrência de isquemia e portanto, a quantidade de lipossomas capaz de chegar aos dois lados do cérebro é praticamente igual. No grupo Sham salina também é encontrada a mesma relação ($1\pm 0,14$; $0,99\pm 0,1$; $1\pm 0,16$; $1,03\pm 0,09$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente) o que, nesse caso, é relacionada a autofluorescência do tecido cerebral, uma vez que esses animais não receberam lipossomas. No grupo MCAo, que sofreu isquemia e, portanto, apresenta diferenças na estrutura da barreira hematoencefálica (aumento de permeabilidade) podemos observar que as fatias do grupo MCAo lipo apresentaram relação maior que 1 ($1,78\pm 0,84$; $2,72\pm 1,47$; $3,48\pm 1,44$; $2,64\pm 1,24$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente). A primeira fatia (1) não apresentou valor estatisticamente diferente quando comparada aos grupos Sham e ao grupo MCAo salina. Mas todas as outras fatias apresentaram valores estatisticamente diferentes tanto dos grupos Sham quando do grupo MCAo salina. O grupo MCAo salina também apresentou relação um pouco maior que 1 ($1,19\pm 0,15$; $1,51\pm 0,03$; $1,8\pm 0,56$; $1,6\pm 0,24$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente) por também ter sofrido a isquemia e ter alterado a permeabilidade da BHE, mas quando comparado com o grupo MCAo lipo a razão do grupo MCAo lipo foi maior nas fatias 2, 3 e 4, possivelmente devido há presença de lipossomas, e conseqüentemente, maior fluorescência no lado direito isquemiado do grupo MCAo lipo, o que não ocorre no grupo salina.

A figura 19 mostra as imagens de fatias de cérebros de animais Sham e MCAo mas que, dessa vez, receberam lipossoma com Ang-(1-7).

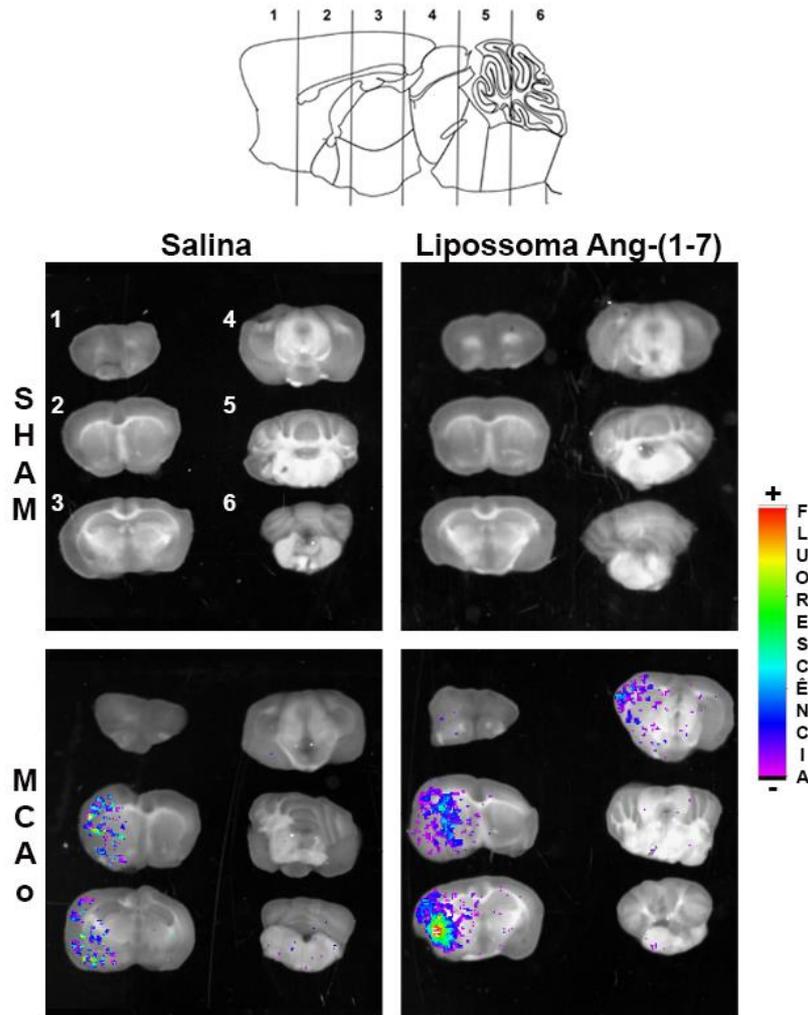


Figura 19: Imagens In Vivo Xtreme do cérebro de camundongos após administração de lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil.

A figura mostra imagens representativas do In Vivo Xtreme de 6 fatias do cérebro de animais Sham e animais MCAo que receberam salina ou uma dose de lipossomas com Ang-(1-7) marcados com Dil por via intravenosa. A primeira fatia corresponde ao número 1, a segunda ao número 2, e assim sucessivamente como indicado no desenho esquemático do cérebro acima das imagens do In Vivo Xtreme.

Nas imagens podemos perceber que assim como nos grupos que receberam lipossomas vazios, houve a chegada das nanopartículas no tecido cerebral. No grupo Sham, mais uma vez, a intensidade de fluorescência foi menor do que no grupo MCAo de modo que não é possível observar na imagem, enquanto no grupo MCAo ela se concentrou na região isquêmica.

O gráfico da figura 20 mostra a análise semi-quantitativa da fluorescência nas fatias de cérebro dos animais que passaram por cirurgia Sham e MCAo e que receberam lipossomas com Ang-(1-7) (imagens da figura 19).

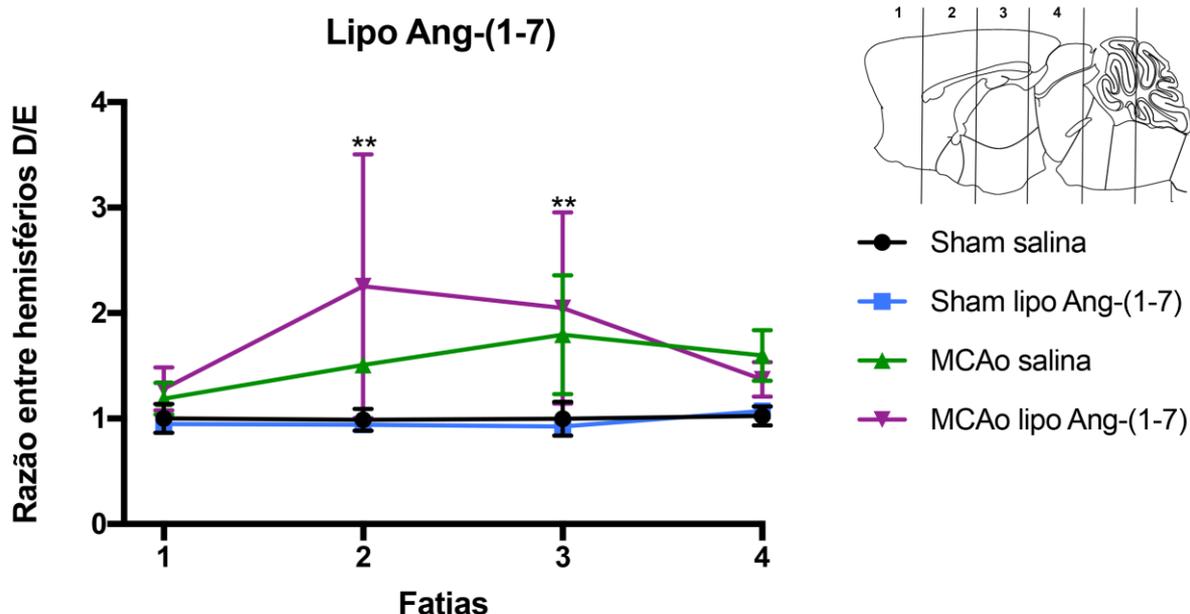


Figura 20: Análise semi-quantitativa da fluorescência no hemisfério direito em comparação com o esquerdo em camundongos que receberam lipossomas contendo Ang-(1-7) marcados com Dil.

A figura mostra a razão dos valores de fluorescência do hemisfério direito (isquemiados) pelo hemisfério esquerdo, para as 4 primeiras fatias do cérebro, como indicado no desenho esquemático. O ** indica que o valor do grupo MCAo lipo Ang só é diferente dos grupos Sham, mas não é diferente do grupo MCAo salina. São mostrados os dados com média \pm DPM. Two way ANOVA, post-hoc Tukey, diferença intergrupos $p < 0,01$ **. N = 4 para cada grupo.

Pelo gráfico é possível observar que mais uma vez os valores dos grupos Sham foram perto de 1 indicando que a quantidade de fluorescência detectada [no caso do grupo Sham lipo Ang-(1-7)] nos dois hemisférios foi igual. Sendo os valores do grupo Sham salina: $1,03 \pm 0,09$; $0,99 \pm 0,1$; $1 \pm 0,16$; $1,03 \pm 0,09$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente, também próximos de 1 mas nesse caso representando somente a autofluorescência do cérebro detectada pelo equipamento. E os valores do grupo Sham lipo Ang-(1-7): $0,96 \pm 0,05$; $0,93 \pm 0,02$; $0,91 \pm 0,05$; $1,09 \pm 0,05$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente. O grupo MCAo salina, sendo o mesmo do gráfico anterior apresentou razão um pouco maior que 1 como já citado anteriormente ($1,19 \pm 0,15$; $1,51 \pm 0,03$; $1,8 \pm 0,56$; $1,6 \pm 0,24$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente). O grupo MCAo lipo Ang-(1-7) ($1,28 \pm 0,21$; $2,25 \pm 1,25$; $2,05 \pm 0,91$; $1,37 \pm 0,16$, para as fatias 1, 2, 3 e 4, respectivamente) apresentou valores um pouco maiores que o MCAo salina, mas nenhum desses valores foi estatisticamente diferente dos valores do grupo MCAo salina, somente diferente dos grupos Sham [salina e lipo Ang-(1-7)].

7 DISCUSSÃO

7.1 Caracterização de lipossomas vazios e com Ang-(1-7)

Para a realização da caracterização dos lipossomas foram escolhidas duas soluções diferentes, o PBS e o aCSF. O PBS é a solução padrão na qual são preparados os lipossomas. Já o aCSF é uma solução que mimetiza o líquido cefalorraquidiano que circunda o SNC e, portanto, essa solução também foi escolhida uma vez que é importante saber se esse tipo de solução seria capaz de alterar alguma característica dos lipossomas, já que o objetivo principal do trabalho é que essas vesículas cheguem ao SNC e ajam no tecido cerebral.

No que diz respeito ao tamanho das vesículas, foi escolhido o valor de 100nm para o diâmetro hidrodinâmico final dos lipossomas. Esse valor foi selecionado uma vez que foi demonstrado, em estudos anteriores, que partículas com tamanho próximo a 100nm tinham acesso facilitado ao SNC, em comparação com partículas maiores (Fukuta, Asai et al. 2016). Além disso, outros trabalhos também já mostraram que o tamanho do lipossoma influencia no nível de captação das vesículas pelo fígado, sendo que vesículas maiores são mais captadas (Harashima, Ohnishi et al. 1992, Harashima, Sakata et al. 1994). E dessa forma, influenciando também no tempo de permanência das vesículas no plasma, o que tem consequência na capacidade das vesículas de chegar à região isquêmica. Portanto, a utilização do valor de 100nm de diâmetro seria o mais recomendado para os objetivos do trabalho. Observando os resultados é possível concluir que o tamanho dos lipossomas, tanto vazios quanto com Ang-(1-7), permaneceu próximo de 100nm, e que o aCSF não foi capaz de alterar esse tamanho.

Com relação ao PDI, índice relacionado a homogeneidade do tamanho da partícula na dispersão analisada, é sabido que um valor menor que 0,3 indica alta homogeneidade e menor que 0,1 uma população única e monodispersa (Hunter and Frisken 1998). Nos resultados podemos observar que o índice obtido na produção dos lipossomas utilizados durante esse trabalho foi menor que 0,08, tanto em PBS quanto em aCSF, evidenciando populações monodispersas de vesículas e mostrando, mais uma vez, que essa solução não foi capaz de alterar as características dos lipossomas.

E finalmente, nesse trabalho foi escolhida a utilização de lipossomas de carga próxima a zero, uma vez que Martorell e colaboradores (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016) mostraram que esse tipo de lipossoma foi mais eficiente em chegar à região isquêmica do cérebro de animais submetidos à MCAo, além de serem encontrados no plasma numa taxa maior, quando comparados com lipossomas positivos e negativos, o que também indica maior estabilidade dessas vesículas e conseqüentemente maior capacidade de chegarem ao SNC. Essa carga superficial próxima de zero é devida a camada de polímero de etileno glicol na superfície dos lipossomas, o que confere também uma captação reduzida pelo fígado e pelo baço, uma maior permanência dos lipossomas na circulação e uma capacidade ampliada para alcançar o SNC (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016). Além disso, quando foi comparado o resultado do potencial Zeta em PBS e em aCSF, tanto para o lipossoma vazio quanto para o lipossoma com Ang-(1-7), foi observado que o aCSF não foi capaz de alterar a carga dos lipossomas, que continuaram neutros.

Diante desses resultados, podemos concluir que o aCSF não foi capaz de alterar nenhuma das características dos lipossomas, o que é importante, uma vez que esses lipossomas estão sendo usados como sistemas carreadores para o SNC. Portanto, é esperado que após chegarem ao SNC, os lipossomas continuem com as suas características iniciais, pois não seria interessante que, uma vez dentro desse sistema, eles perdessem tais características.

Também foram realizados experimentos para se determinar a taxa de encapsulação e a concentração da Ang-(1-7) nos lipossomas. E os resultados obtidos foram uma taxa de encapsulação de 5,7% e a concentração de 0,0016 mg/mL. Apesar de ter sido realizado um protocolo de preparo de lipossomas com Ang-(1-7) já feito antes, no qual a taxa de encapsulação obtida foi de 15% (Silva-Barcellos, Frezard et al. 2001), e portanto, tendo uma taxa de encapsulação considerada baixa, no trabalho anterior, o tamanho do lipossoma utilizado foi de 200nm, e no trabalho atual foram utilizados lipossomas de 100nm. O fato de terem sido usados lipossomas menores poderia explicar o valor relativamente baixo da taxa de encapsulação.

7.2 Biodistribuição e cinética dos lipossomas

7.2.1 Biodistribuição

Os lipossomas foram marcados com a sonda fluorescente e lipofílica Dil visando avaliar a sua distribuição e cinética no plasma por imagem de fluorescência, após administração intravenosa em camundongos. O Dil é um marcador amplamente utilizado para marcação de tecidos e de células. Ele não afeta a viabilidade, o desenvolvimento ou propriedades fisiológicas básicas das células marcadas (Honig and Hume 1986, Honig and Hume 1989).

Como o Dil é um marcador lipofílico, ele vai se ligar à bicamada lipídica dos lipossomas (que lembra a membrana plasmática das células). Esse tipo de marcador é bastante eficiente, sendo detectado em membranas celulares fixadas por até 2 anos (von Bartheld, Cunningham et al. 1990). No geral, o Dil não se desloca de uma membrana marcada para outra não marcada, no entanto, esse deslocamento pode ocorrer após alguma ruptura da membrana (Honig and Hume 1986, Hofmann and Bleckmann 1999). Portanto, é esperado que a intensidade de fluorescência detectada seja um indicativo da presença de lipossomas no tecido, mas como não é possível saber exatamente se as vesículas estão íntegras ou degradadas, alguns dos registros podem ter sido somente de um pedaço da membrana dos lipossomas com o marcador e não das vesículas íntegras.

Os resultados obtidos na biodistribuição, através das leituras no In Vivo Xtreme, são dados da medida de fótons/seg/mm² que é uma unidade que fornece um valor da fluorescência emitida pelo tecido e assim detectada pelo aparelho. Esses resultados são medidas semi-quantitativas e por isso os resultados aqui apresentados também são semi-quantitativos com a demonstração de um perfil de biodistribuição entre os órgãos analisados (Tansi, Ruger et al. 2017).

Os órgãos escolhidos foram baço, fígado, pulmão, rim e cérebro. O baço e o fígado foram escolhidos uma vez que eles são órgãos importante para o metabolismo, e porque outros estudos já demonstraram que, esses órgãos apresentam altos sinais de detecção de lipossomas quando se trata de biodistribuição (Gabizon, Price et al. 1990, Fukuta, Ishii et al. 2015). O rim é um dos principais órgãos excretores do organismo e por isso foi escolhido. Além disso, outro

órgão suscetível à interação com lipossomas como os pulmões (Tansi, Ruger et al. 2017) também foi escolhido, e finalmente o nosso órgão alvo, o cérebro.

Ao analisarmos os resultados obtidos para os lipossomas vazios e com Ang-(1-7), podemos perceber a detecção de fluorescência no baço, assim como já descrito anteriormente (Gabizon, Price et al. 1990, Fukuta, Ishii et al. 2015) e esperado, pelo fato do baço ter maior capacidade de retenção de nanopartículas, devido aos macrófagos residentes que são responsáveis por capturar moléculas circulantes no sangue (Li and Huang 2008).

Os valores obtidos para o fígado, tanto dos lipossomas vazios, quanto dos lipossomas com Ang-(1-7), podem ser considerados mais altos quando comparados com os outros órgãos, uma vez que o fígado é um órgão muito importante para o metabolismo. E mesmo utilizando lipossomas de tamanho menor (100nm) e peguinhos eles ainda foram captados pelo fígado, que também possui grande quantidade de macrófagos residentes (Li and Huang 2008), o que pode ter contribuído para essa alta captação.

O pulmão por ser um órgão mais suscetível (Tansi, Ruger et al. 2017), também foi capaz de captar uma quantidade relativa de lipossomas, tanto vazios quanto com Ang-(1-7). Além disso, ele também é um órgão bastante irrigado e com alta taxa de fluxo sanguíneo, o que também deve ser considerado, quando se trata de retenção de nanopartículas nos órgãos (Yamashita and Hashida 2013).

O rim apresentou valores relativamente altos, o que poderia indicar uma excreção renal. Contudo, pelo caráter lipofílico e pelo tamanho das vesículas produzidas nesse trabalho, é pouco provável que a intensidade de fluorescência detectada nos rins seja devido a excreção de lipossomas intactos por esse órgão (Yamashita and Hashida 2013). Portanto, nesse caso, a fluorescência observada pode ser somente de fragmentos da membrana do lipossoma que continham o marcador ou até de produtos do metabolismo das vesículas ou do Dil que foram eliminados pelos rins. E, como já foi citado anteriormente, apesar do marcador Dil ser bastante usado e não ter alta capacidade de se deslocar de membranas marcadas para não marcadas, isso ainda pode ser a explicação para a alta intensidade de fluorescência detectada nos rins.

Além disso, também foi possível observar a presença de fluorescência no cérebro, tanto dos animais que receberam lipossomas vazios, quanto dos animais que receberam lipossomas com Ang-(1-7). Como esses animais eram naïves e, portanto, não tinham passado por nenhuma cirurgia ou outro procedimento além da injeção dos lipossomas, eles apresentavam a BHE intacta. Como os animais foram perfundidos com salina antes da coleta dos órgãos, toda a fluorescência observada em todos os órgãos, e também no cérebro, pode ser atribuída à fluorescência dos lipossomas que chegaram a esses tecidos. Portanto, os lipossomas em questão, apesar de não apresentarem nenhum tipo de alteração na sua bicamada lipídica para aumentar sua entrada no SNC, ainda foram capazes de atravessar a BHE e chegar ao tecido cerebral.

7.2.2 *Cinética no plasma*

Todas as nanopartículas que chegam a circulação sanguínea interagem com proteínas plasmáticas, que se ligam a superfície das nanopartículas formando um complexo entre elas, o que vai influenciar o processo de internalização das mesmas por macrófagos e conseqüentemente toda a sua biodistribuição pelos órgãos do corpo (Owens and Peppas 2006, Aggarwal, Hall et al. 2009). Sendo que, as nanopartículas que interagem mais com essas proteínas formam complexos mais instáveis, sendo eliminadas mais rapidamente do plasma (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016).

Martorell e colaboradores (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016) mostraram que dentre os diferentes tipos de lipossomas carregados (positivo, neutro e negativo), os neutros e negativos foram os únicos observados no plasma, após 90 minutos de administração, e que entre eles, os neutros ainda se mostraram mais estáveis, presentes no plasma em maiores concentrações que os negativos 1,5 e 4 horas após sua administração.

Alguns estudos *in vitro* também mostraram que nanopartículas neutras têm menor taxa de opsonização, quando comparadas com partículas carregadas, o que reduz a sua captação por macrófagos, contribuindo para o aumento do seu tempo no plasma (Roser, Fischer et al. 1998, Owens and Peppas 2006).

Portanto, lipossomas neutros são os mais propícios para utilização, uma vez que eles são mais estáveis, ficando mais tempo no plasma, e assim conseguindo atingir o tecido de interesse. E os nossos resultados confirmaram essa estabilidade, uma vez que conseguimos observar tanto a presença dos lipossomas vazios, quanto dos lipossomas com Ang-(1-7) no plasma até 24 horas após sua administração.

Outro fato que também contribuiu para o aumento dessa estabilidade e aumento do tempo das vesículas no plasma, foi a presença do PEG, como já citado anteriormente.

7.3 Concentração dos lipossomas na região isquêmica

Para se estudar a distribuição cerebral dos lipossomas em animais que passaram por cirurgia de isquemia e os animais Sham, esses camundongos receberam uma injeção intravenosa das dispersões de lipossomas, imediatamente após o início da reperfusão. Vinte e quatro horas após a injeção, esses animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros retirados para imagem no In Vivo Xtreme e detecção da localização dos lipossomas nas fatias cerebrais.

Como já foi exposto anteriormente, um dos maiores problemas encontrados atualmente no tratamento de doenças do SNC é a chegada do fármaco no tecido cerebral, uma vez que o cérebro é protegido por uma barreira que controla a entrada de solutos no sistema, impedindo assim que substâncias tóxicas cheguem ao órgão e causem danos. Mas a presença dessa barreira protetora acaba dificultando os tratamentos de doenças nesse sistema e, por isso, muitas alternativas vêm sendo estudadas de modo a possibilitar a chegada de fármacos no SNC para o tratamento das doenças.

Uma das opções que ganhou bastante destaque foi o uso de nanopartículas, sendo que os lipossomas são um dos sistemas carreadores mais utilizados. Por isso, nesse trabalho foram escolhidas características específicas para essas nanopartículas, já descritas anteriormente, como facilitadoras da entrada das vesículas no SNC, apesar de não termos optado por nenhuma alteração na bicamada lipídica, como introdução de ligantes que poderiam aumentar essa passagem.

Ao analisarmos os resultados, conseguimos observar que os lipossomas foram capazes de atravessar a BHE de animais naïve e chegar ao SNC. Dessa forma, o próximo passo foi olhar para uma condição de doença e observar a distribuição dos lipossomas nessas condições.

Alguns estudos vêm mostrando que durante a isquemia e reperfusão cerebral são alteradas as características da BHE, além dos processos inflamatórios decorrentes na região isquêmica, que acabam aumentando a permeabilidade da BHE e possibilitando a entrada facilitada de substâncias nessa região (Campos-Martorell, Cano-Sarabia et al. 2016). Dessa forma, é também facilitado o acúmulo dos lipossomas na região isquêmica, o que foi confirmado pelos nossos resultados.

É possível observar um acúmulo, tanto de lipossomas vazios, quanto de lipossomas com Ang-(1-7), no hemisfério direito (lado isquêmico) dos animais quando comparado com o esquerdo. É importante também destacar que todos os animais submetidos à cirurgia de isquemia tiveram uma redução do fluxo sanguíneo de aproximadamente 70%, como mostrado na figura 16, o que confirma a indução da isquemia nesses animais.

Nos gráficos de quantificação da fluorescência encontradas nos dois hemisférios, podemos observar que nos grupos Sham essa razão ficou em torno de 1, o que indica que a quantidade de fluorescência detectada foi igual nos dois hemisférios, e nos grupos MCAo essa razão aumenta indicando uma maior detecção de fluorescência no lado direito, quando comparado com o esquerdo. Os resultados do grupo Sham foram mais homogêneos, enquanto maiores variabilidades intragrupo foram encontradas nos animais isquemiados, mas isso pode ser explicado pela variação na severidade da lesão isquêmica e consequente variação no tamanho da lesão, o que influencia na quantidade de lipossoma que consegue chegar à região isquêmica e, conseqüentemente, na quantidade de fluorescência detectada.

Além disso, também foi possível observar nos grupos MCAo que receberam somente salina, que apesar de não terem fluorescência derivada dos lipossomas, eles apresentaram uma diferença na razão entre os lados direito e esquerdo. Apesar de ser um resultado inesperado, como já foi descrito anteriormente, durante

o processo de isquemia/reperfusão há alteração da estrutura da BHE e um processo inflamatório na região o que aumenta a permeabilidade dessa barreira, possibilitando a entrada de várias substâncias, inclusive água, gerando um edema na região. Isso poderia ser a causa dos valores acima de 1 na razão entre os hemisférios, mas não podemos, diante somente dos nossos resultados, ter essa confirmação. Mas quando os dados do grupo MCAo salina são comparados com os dados do MCAo lipo vazio, podemos perceber que os valores do último grupo são estatisticamente maiores que os do grupo salina, nas fatias mais afetadas pela isquemia (fatia 2, 3 e 4), justamente porque nesse grupo existe a presença dos lipossomas e no outro não. Quando analisamos os mesmos dados do grupo MCAo lipo Ang-(1-7) e MCAo salina, não vemos diferença entre as razões, como foi observado no grupo MCAo lipo vazio. Dois fatos podem ter influenciado nesse resultado. O primeiro é que a dispersão de lipossomas com Ang-(1-7) injetada apresenta concentração menor (50mM) do que a dispersão de lipossomas vazios (90mM). Portanto, a diferença observada entre os grupos MCAo lipo vazio e MCAo lipo Ang-(1-7) pode ser explicada por essa diferença de concentrações entre as dispersões. O segundo fato é que, além da concentração, uma outra diferença entre os lipossomas é a presença da Ang-(1-7). Neste caso pode estar acontecendo alguma ação do próprio peptídeo na região isquêmica, o que levou a essa redução na presença de lipossomas no tecido.

Já é de amplo conhecimento que a Ang-(1-7) têm demonstrado efeitos neuroprotetores em situações de isquemia. O nosso grupo já demonstrou essa ação neuroprotetora em tecidos submetidos à isquemia. E Mecca e colaboradores mostraram o efeito neuroprotetor da Ang-(1-7) em animais submetidos à cirurgia de isquemia, havendo redução do volume de infarto dos animais tratados quando comparados com o grupo isquemiado não tratado (Mecca, Regenhardt et al. 2011). Portanto, é esperado que a Ang-(1-7) seja capaz de agir sobre o tecido cerebral isquemiado, também quando encapsulado em lipossomas, e assim reduzir o volume de infarto reduzindo também a quantidade de lipossomas detectados na região isquêmica. Essa análise do possível tratamento da Ang-(1-7) em modelos de isquemia *in vivo* ainda será avaliado, como continuidade dos estudos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como descrito anteriormente, o uso de lipossomas como um sistema carreador de fármacos é uma estratégia promissora para a redução de efeitos adversos e o aumento da eficácia do fármaco pela alteração da sua biodistribuição, quando comparado com o fármaco livre (Ishii, Fukuta et al. 2013). Os lipossomas mostram várias vantagens, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, habilidade de proteger os fármacos encapsulados e capacidade de transporte por membranas biológicas (Elbayoumi and Torchilin 2010). Os lipossomas têm sido usados para tratamentos de diversas doenças como câncer, infecções bacterianas e fúngicas e eles são capazes de proporcionar aumento da eficácia de vários fármacos (Spuch and Navarro 2011).

Além disso, sabendo de toda a dificuldade no tratamento de doenças do SNC devido a presença da BHE e que durante a isquemia a permeabilidade dessa barreira é alterada, possibilitando a concentração de partículas na região isquemiada, o uso dos lipossomas se torna uma ferramenta bastante promissora nesse quesito.

Portanto, nesse trabalho, vários estudos foram feitos com lipossomas teoricamente simples, com apenas três lipídeos, e um marcador fluorescente que possibilitou o mapeamento dessas vesículas, mas com características que potencializaram a sua capacidade de se comportar como um bom carreador para os objetivos do trabalho.

Através dos resultados foi possível observar que os lipossomas foram encontrados nos órgãos que participam do metabolismo e excreção, o que já era esperado, uma vez que eles não possuem nenhuma alteração na membrana, mas também foram capazes de atravessar a BHE, mesmo em condições não patológicas, e chegar ao tecido cerebral. Além disso, eles também foram capazes de se acumular na região isquêmica dos animais MCAo e, portanto, demonstraram todo o seu potencial como nanocarreadores para o tratamento de doenças no SNC, principalmente do AVE.

9 CONCLUSÃO

O aCSF não altera nenhuma das características dos lipossomas vazios ou com Ang-(1-7), analisadas nesse trabalho; tais lipossomas se distribuíram pelos diversos órgãos de animais naïve ou isquemiados, se concentrando principalmente na região isquemiada do cérebro de animais que passaram pela cirurgia de oclusão da artéria cerebral média e demonstrando seu potencial como carreadores de fármacos para a região isquêmica e como terapia para o AVE.

10 REFERÊNCIAS

- Adeoye, O., R. Hornung, P. Khatri and D. Kleindorfer (2011). "Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years." Stroke **42**(7): 1952-1955.
- Aggarwal, P., J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia and S. E. McNeil (2009). "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy." Adv Drug Deliv Rev **61**(6): 428-437.
- Alam, M. I., S. Beg, A. Samad, S. Baboota, K. Kohli, J. Ali, A. Ahuja and M. Akbar (2010). "Strategy for effective brain drug delivery." Eur J Pharm Sci **40**(5): 385-403.
- Alyautdin, R., I. Khalin, M. I. Nafeeza, M. H. Haron and D. Kuznetsov (2014). "Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier." Int J Nanomedicine **9**: 795-811.
- Azad, T. D., J. Pan, I. D. Connolly, A. Remington, C. M. Wilson and G. A. Grant (2015). "Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier." Neurosurg Focus **38**(3): E9.
- Azevedo, E. G., R. R. Ribeiro, S. M. da Silva, C. S. Ferreira, L. E. de Souza, A. A. Ferreira, E. C. R. A. de Oliveira, C. Demicheli, S. A. Rezende and F. Frezard (2014). "Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis." Expert Opin Drug Deliv **11**(10): 1551-1560.
- Bader, M. (2013). "ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin." Pflugers Arch **465**(1): 79-85.
- Bae, C. Y. and H. S. Sun (2011). "TRPM7 in cerebral ischemia and potential target for drug development in stroke." Acta Pharmacol Sin **32**(6): 725-733.
- Batrakova, E. V., H. E. Gendelman and A. V. Kabanov (2011). "Cell-mediated drug delivery." Expert Opin Drug Deliv **8**(4): 415-433.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-1437.
- Beduneau, A., P. Saulnier and J. P. Benoit (2007). "Active targeting of brain tumors using nanocarriers." Biomaterials **28**(33): 4947-4967.
- Begley, D. J. and M. W. Brightman (2003). "Structural and functional aspects of the blood-brain barrier." Prog Drug Res **61**: 39-78.
- Bellavance, M. A., M. Blanchette and D. Fortin (2008). "Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy." AAPS J **10**(1): 166-177.
- Benjamin, E. J., M. J. Blaha, S. E. Chiuve, M. Cushman, S. R. Das, R. Deo, S. D. de Ferranti, J. Floyd, M. Fornage, C. Gillespie, C. R. Isasi, M. C. Jimenez, L. C. Jordan, S. E. Judd, D. Lackland, J. H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C. T. Longenecker, R. H. Mackey, K. Matsushita, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, L. Palaniappan, D. K. Pandey, R. R. Thiagarajan, M. J. Reeves, M. Ritchey, C. J. Rodriguez, G. A. Roth, W. D. Rosamond, C. Sasson, A. Towfighi, C. W. Tsao, M. B. Turner, S. S. Virani, J. H. Voeks, J. Z. Willey, J. T. Wilkins, J. H. Wu, H. M. Alger, S. S. Wong, P. Muntner, C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics (2017). "Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **135**(10): e146-e603.
- Bennion, D. M., E. Haltigan, R. W. Regenhardt, U. M. Steckelings and C. Sumners (2015). "Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke." Curr Hypertens Rep **17**(2): 3.
- Bjorklund, A. and O. Lindvall (2000). "Cell replacement therapies for central nervous system disorders." Nat Neurosci **3**(6): 537-544.

Bobo, R. H., D. W. Laske, A. Akbasak, P. F. Morrison, R. L. Dedrick and E. H. Oldfield (1994). "Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2076-2080.

Bozzuto, G. and A. Molinari (2015). "Liposomes as nanomedical devices." Int J Nanomedicine **10**: 975-999.

Budai, M. and M. Szogyi (2001). "[Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes]." Acta Pharm Hung **71**(1): 114-118.

Campos-Martorell, M., M. Cano-Sarabia, A. Simats, M. Hernandez-Guillamon, A. Rosell, D. MasPOCH and J. Montaner (2016). "Charge effect of a liposomal delivery system encapsulating simvastatin to treat experimental ischemic stroke in rats." Int J Nanomedicine **11**: 3035-3048.

Chapman, C. D., W. H. Frey, 2nd, S. Craft, L. Danielyan, M. Hallschmid, H. B. Schioth and C. Benedict (2013). "Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans." Pharm Res **30**(10): 2475-2484.

Chen, K. B., V. C. Wei, L. F. Yen, K. S. Poon, Y. C. Liu, K. S. Cheng, C. S. Chang and T. W. Lai (2013). "Intravenous mannitol does not increase blood-brain barrier permeability to inert dyes in the adult rat forebrain." Neuroreport **24**(6): 303-307.

Chen, Y. and L. Liu (2012). "Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier." Adv Drug Deliv Rev **64**(7): 640-665.

Crawford, L., J. Rosch and D. Putnam (2016). "Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood-brain barrier to the central nervous system." J Control Release **240**: 251-266.

DiMasi, J. A., L. Feldman, A. Seckler and A. Wilson (2010). "Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs." Clin Pharmacol Ther **87**(3): 272-277.

Dirnagl, U., C. Iadecola and M. A. Moskowitz (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.

Dromi, S., V. Frenkel, A. Luk, B. Traugher, M. Angstadt, M. Bur, J. Poff, J. Xie, S. K. Libutti, K. C. Li and B. J. Wood (2007). "Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect." Clin Cancer Res **13**(9): 2722-2727.

Dwibhashyam, V. S. and A. N. Nagappa (2008). "Strategies for enhanced drug delivery to the central nervous system." Indian J Pharm Sci **70**(2): 145-153.

el-Bacha, R. S. and A. Minn (1999). "Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(1): 15-23.

Elbayoumi, T. A. and V. P. Torchilin (2010). "Current trends in liposome research." Methods Mol Biol **605**: 1-27.

Etame, A. B., R. J. Diaz, M. A. O'Reilly, C. A. Smith, T. G. Mainprize, K. Hynynen and J. T. Rutka (2012). "Enhanced delivery of gold nanoparticles with therapeutic potential into the brain using MRI-guided focused ultrasound." Nanomedicine **8**(7): 1133-1142.

Feuerstein, G. Z. and X. Wang (2000). "Animal models of stroke." Mol Med Today **6**(3): 133-135.

Foley, C. P., D. G. Rubin, A. Santillan, D. Sondhi, J. P. Dyke, R. G. Crystal, Y. P. Gobin and D. J. Ballon (2014). "Intra-arterial delivery of AAV vectors to the mouse brain after mannitol mediated blood brain barrier disruption." J Control Release **196**: 71-78.

Fornaguera, C., A. Dols-Perez, G. Caldero, M. J. Garcia-Celma, J. Camarasa and C. Solans (2015). "PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier." J Control Release **211**: 134-143.

Frezard, F. (1999). "Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines." Braz J Med Biol Res **32**(2): 181-189.

Frezard, F., R. A. dos Santos and M. A. Fontes (2011). "Liposome-encapsulated neuropeptides for site-specific microinjection." Methods Mol Biol **789**: 343-355.

Frézard, F., D. A. Schettini, O. G. F. Rocha and C. Demicheli (2005). "Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio." Química Nova **28**: 511-518.

Fukuta, T., T. Asai, A. Sato, M. Namba, Y. Yanagida, T. Kikuchi, H. Koide, K. Shimizu and N. Oku (2016). "Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil." Int J Pharm **506**(1-2): 129-137.

Fukuta, T., T. Ishii, T. Asai, A. Sato, T. Kikuchi, K. Shimizu, T. Minamino and N. Oku (2015). "Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions." Eur J Pharm Biopharm **97**(Pt A): 1-7.

Gabathuler, R. (2010). "Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases." Neurobiol Dis **37**(1): 48-57.

Gabizon, A., D. C. Price, J. Huberty, R. S. Bresalier and D. Papahadjopoulos (1990). "Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies." Cancer Res **50**(19): 6371-6378.

Gabizon, A. A., H. Shmeeda and S. Zalipsky (2006). "Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting." J Liposome Res **16**(3): 175-183.

Gasselhuber, A., M. R. Dreher, A. Negussie, B. J. Wood, F. Rattay and D. Haemmerich (2010). "Mathematical spatio-temporal model of drug delivery from low temperature sensitive liposomes during radiofrequency tumour ablation." Int J Hyperthermia **26**(5): 499-513.

Gastaldi, L., L. Battaglia, E. Peira, D. Chirio, E. Muntoni, I. Solazzi, M. Gallarate and F. Dosio (2014). "Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art." Eur J Pharm Biopharm **87**(3): 433-444.

Ginsberg, M. D. (2008). "Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future." Neuropharmacology **55**(3): 363-389.

Gynther, M., K. Laine, J. Ropponen, J. Leppanen, A. Mannila, T. Nevalainen, J. Savolainen, T. Jarvinen and J. Rautio (2008). "Large neutral amino acid transporter enables brain drug delivery via prodrugs." J Med Chem **51**(4): 932-936.

Hanson, L. R. and W. H. Frey, 2nd (2008). "Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease." BMC Neurosci **9 Suppl 3**: S5.

Harashima, H., Y. Ohnishi and H. Kiwada (1992). "In vivo evaluation of the effect of the size and opsonization on the hepatic extraction of liposomes in rats: an application of Oldendorf method." Biopharm Drug Dispos **13**(7): 549-553.

Harashima, H., K. Sakata, K. Funato and H. Kiwada (1994). "Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes." Pharm Res **11**(3): 402-406.

Hofmann, M. H. and H. Bleckmann (1999). "Effect of temperature and calcium on transneuronal diffusion of Dil in fixed brain preparations." J Neurosci Methods **88**(1): 27-31.

Honig, M. G. and R. I. Hume (1986). "Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures." J Cell Biol **103**(1): 171-187.

Honig, M. G. and R. I. Hume (1989). "DiI and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing." Trends Neurosci **12**(9): 333-335, 340-331.

Hossmann, K. A. (1994). "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." Ann Neurol **36**(4): 557-565.

Hunter, D. G. and B. J. Frisken (1998). "Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles." Biophys J **74**(6): 2996-3002.

Iadecola, C. (1997). "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury." Trends Neurosci **20**(3): 132-139.

Iadecola, C. and J. Anrather (2011). "The immunology of stroke: from mechanisms to translation." Nat Med **17**(7): 796-808.

Ishii, T., T. Asai, D. Oyama, Y. Agato, N. Yasuda, T. Fukuta, K. Shimizu, T. Minamino and N. Oku (2013). "Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506." FASEB J **27**(4): 1362-1370.

Ishii, T., T. Fukuta, Y. Agato, D. Oyama, N. Yasuda, K. Shimizu, A. T. Kawaguchi, T. Asai and N. Oku (2013). "Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced." Biochem Biophys Res Commun **430**(4): 1201-1205.

Iusuf, D., R. H. Henning, W. H. van Gilst and A. J. Roks (2008). "Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 303-312.

Jiang, T., L. Gao, J. Lu and Y. D. Zhang (2013). "ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke." Curr Neuropharmacol **11**(2): 209-217.

Jiang, X., A. V. Andjelkovic, L. Zhu, T. Yang, M. V. L. Bennett, J. Chen, R. F. Keep and Y. Shi (2017). "Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke." Prog Neurobiol.

Jones, A. R. and E. V. Shusta (2007). "Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation." Pharm Res **24**(9): 1759-1771.

Jones, P. M. and A. M. George (2004). "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research." Cell Mol Life Sci **61**(6): 682-699.

Joshi, S., A. Ergin, M. Wang, R. Reif, J. Zhang, J. N. Bruce and I. J. Bigio (2011). "Inconsistent blood brain barrier disruption by intraarterial mannitol in rabbits: implications for chemotherapy." J Neurooncol **104**(1): 11-19.

Kang, Y. S., H. J. Jung, J. S. Oh and D. Y. Song (2016). "Use of PEGylated Immunoliposomes to Deliver Dopamine Across the Blood-Brain Barrier in a Rat Model of Parkinson's Disease." CNS Neurosci Ther **22**(10): 817-823.

Katsura, K., T. Kristian and B. K. Siesjo (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." Biochem Soc Trans **22**(4): 991-996.

Kirby, C. and G. Gregoriadis (1983). "The effect of lipid composition of small unilamellar liposomes containing melphalan and vincristine on drug clearance after injection into mice." Biochem Pharmacol **32**(4): 609-615.

Kirby, C. and G. Gregoriadis (1984). "Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes." Nat Biotech **2**(11): 979-984.

Koo, Y. E., G. R. Reddy, M. Bhojani, R. Schneider, M. A. Philbert, A. Rehemtulla, B. D. Ross and R. Kopelman (2006). "Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatfoms." Adv Drug Deliv Rev **58**(14): 1556-1577.

Larsen, J. M., D. R. Martin and M. E. Byrne (2014). "Recent advances in delivery through the blood-brain barrier." Curr Top Med Chem **14**(9): 1148-1160.

Li, S. D. and L. Huang (2008). "Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles." Mol Pharm **5**(4): 496-504.

Li, X., J. Tsibouklis, T. Weng, B. Zhang, G. Yin, G. Feng, Y. Cui, I. N. Savina, L. I. Mikhalovska, S. R. Sandeman, C. A. Howel and S. V. Mikhalovsky (2017). "Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier." J Drug Target **25**(1): 17-28.

Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 3-26.

Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson and R. Cummins (1989). "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." Stroke **20**(1): 84-91.

Lu, J., T. Jiang, L. Wu, L. Gao, Y. Wang, F. Zhou, S. Zhang and Y. Zhang (2013). "The expression of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis are upregulated after acute cerebral ischemic stroke in rats." Neuropeptides **47**(5): 289-295.

Luk, Y. O., W. Y. Chen, W. J. Wong, H. H. Hu, L. C. Hsu, C. M. Chern, K. J. Huang and S. L. Law (2004). "Treatment of focal cerebral ischemia with liposomal nerve growth factor." Drug Deliv **11**(5): 319-324.

Luo, T., J. Wang, S. Hao, T. Guo, P. Ren, Z. Cheng, F. Gao, Y. Gong and B. Wang (2017). "Brain Drug Delivery Systems for the Stroke Intervention and Recovery." Curr Pharm Des **23**(15): 2258-2267.

Martin, R. L., H. G. Lloyd and A. I. Cowan (1994). "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?" Trends Neurosci **17**(6): 251-257.

Masserini, M. (2013). "Nanoparticles for brain drug delivery." ISRN Biochem **2013**: 238428.

Mayer, L. D., M. J. Hope, P. R. Cullis and A. S. Janoff (1985). "Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles." Biochim Biophys Acta **817**(1): 193-196.

Mayer, S. A. and F. Rincon (2005). "Treatment of intracerebral haemorrhage." Lancet Neurol **4**(10): 662-672.

McCarthy, C. A., A. Vinh, B. R. Broughton, C. G. Sobey, J. K. Callaway and R. E. Widdop (2012). "Angiotensin II type 2 receptor stimulation initiated after stroke causes neuroprotection in conscious rats." Hypertension **60**(6): 1531-1537.

Mecca, A. P., T. E. O'Connor, M. J. Katovich and C. Sumners (2009). "Candesartan pretreatment is cerebroprotective in a rat model of endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion." Exp Physiol **94**(8): 937-946.

Mecca, A. P., R. W. Regenhardt, T. E. O'Connor, J. P. Joseph, M. K. Raizada, M. J. Katovich and C. Sumners (2011). "Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke." Exp Physiol **96**(10): 1084-1096.

Meredith, M. E., T. S. Salameh and W. A. Banks (2015). "Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases." AAPS J **17**(4): 780-787.

Miller, J., C. Hartwell and C. Lewandowski (2012). "Stroke treatment using intravenous and intra-arterial tissue plasminogen activator." Curr Treat Options Cardiovasc Med **14**(3): 273-283.

Min, L. J., M. Mogi, K. Tsukuda, F. Jing, K. Ohshima, H. Nakaoka, H. Kan-No, X. L. Wang, T. Chisaka, H. Y. Bai, J. Iwanami and M. Horiuchi (2014). "Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage." Am J Hypertens **27**(8): 1036-1044.

Moghimi, S. M., A. C. Hunter and J. C. Murray (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.

Mora, M., M. L. Sagrista, D. Trombetta, F. P. Bonina, A. De Pasquale and A. Saija (2002). "Design and characterization of liposomes containing long-chain N-acylPEs for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain." Pharm Res **19**(10): 1430-1438.

Mukherjee, D. and C. G. Patil (2011). "Epidemiology and the global burden of stroke." World Neurosurg **76**(6 Suppl): S85-90.

Nayar, R., M. J. Hope and P. R. Cullis (1989). "Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **986**(2): 200-206.

Noble, G. T., J. F. Stefanick, J. D. Ashley, T. Kiziltepe and B. Bilgicer (2014). "Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations." Trends Biotechnol **32**(1): 32-45.

Obrenovitch, T. P. (1995). "The ischaemic penumbra: twenty years on." Cerebrovasc Brain Metab Rev **7**(4): 297-323.

Ong, H. T., L. M. Ong and J. J. Ho (2013). "Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (ACEIs) and Angiotensin-Receptor Blockers (ARBs) in Patients at High Risk of Cardiovascular Events: A Meta-Analysis of 10 Randomised Placebo-Controlled Trials." ISRN Cardiol **2013**: 478597.

Owens, D. E., 3rd and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." Int J Pharm **307**(1): 93-102.

Pan, A., Q. Sun, O. I. Okereke, K. M. Rexrode and F. B. Hu (2011). "Depression and risk of stroke morbidity and mortality: a meta-analysis and systematic review." JAMA **306**(11): 1241-1249.

Pardridge, W. M. (2002). "William Pardridge discusses the lack of BBB research. Interview by Rebecca N. Lawrence." Drug Discov Today **7**(4): 223-226.

Patel, M. M., B. R. Goyal, S. V. Bhadada, J. S. Bhatt and A. F. Amin (2009). "Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery." CNS Drugs **23**(1): 35-58.

Patel, M. M. and B. M. Patel (2017). "Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain." CNS Drugs **31**(2): 109-133.

Perche, F. and V. P. Torchilin (2013). "Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting." J Drug Deliv **2013**: 705265.

Puri, A., K. Loomis, B. Smith, J. H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman and R. Blumenthal (2009). "Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **26**(6): 523-580.

Rafii, M. S. and A. E. Hillis (2006). "Compendium of cerebrovascular diseases." Int Rev Psychiatry **18**(5): 395-407.

Rautio, J., K. Laine, M. Gynther and J. Savolainen (2008). "Prodrug approaches for CNS delivery." AAPS J **10**(1): 92-102.

Regenhardt, R. W., D. M. Bennion and C. Sumners (2014). "Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke." Clin Sci (Lond) **126**(3): 195-205.

Regenhardt, R. W., A. P. Mecca, F. Desland, P. F. Ritucci-Chinni, J. A. Ludin, D. Greenstein, C. Banelos, J. L. Bizon, M. K. Reinhard and C. Sumners (2014). "Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Exp Physiol **99**(2): 442-453.

Reinhold, A. K. and H. L. Rittner (2017). "Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review." Pflugers Arch **469**(1): 123-134.

Rosenberg, G. A. and Y. Yang (2007). "Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia." Neurosurg Focus **22**(5): E4.

Roser, M., D. Fischer and T. Kissel (1998). "Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats." Eur J Pharm Biopharm **46**(3): 255-263.

Santos, R. A. (2014). "Angiotensin-(1-7)." Hypertension **63**(6): 1138-1147.

Santos, R. A., A. J. Ferreira, T. Verano-Braga and M. Bader (2013). "Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system." J Endocrinol **216**(2): R1-R17.

Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H. P. Schultheiss, R. Speth and T. Walther (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-8263.

Sifat, A. E., B. Vaidya and T. J. Abbruscato (2017). "Blood-Brain Barrier Protection as a Therapeutic Strategy for Acute Ischemic Stroke." AAPS J **19**(4): 957-972.

Silva-Barcellos, N. M., F. Frezard, S. Caligiorne and R. A. Santos (2001). "Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla." Hypertension **38**(6): 1266-1271.

Simoes, S., J. N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes and M. C. de Lima (2004). "On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times." Adv Drug Deliv Rev **56**(7): 947-965.

Spuch, C. and C. Navarro (2011). "Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease)." Journal of Drug Delivery **2011**: 12.

Stockwell, J., N. Abdi, X. Lu, O. Maheshwari and C. Taghibiglou (2014). "Novel central nervous system drug delivery systems." Chem Biol Drug Des **83**(5): 507-520.

Sun, Z., M. Worden, Y. Wroczynskyj, V. Yathindranath, J. van Lierop, T. Hegmann and D. W. Miller (2014). "Magnetic field enhanced convective diffusion of iron oxide nanoparticles in an osmotically disrupted cell culture model of the blood-brain barrier." Int J Nanomedicine **9**: 3013-3026.

Tam, V. H., C. Sosa, R. Liu, N. Yao and R. D. Priestley (2016). "Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier." Int J Pharm **515**(1-2): 331-342.

Tancini, B., G. Tosi, B. Bortot, D. Dolcetta, A. Magini, E. De Martino, L. Urbanelli, B. Ruozi, F. Forni, C. Emiliani, M. A. Vandelli and G. M. Severini (2015). "Use of Polylactide-Co-Glycolide-Nanoparticles for Lysosomal Delivery of a Therapeutic Enzyme in Glycogenosis Type II Fibroblasts." J Nanosci Nanotechnol **15**(4): 2657-2666.

Tansi, F. L., R. Ruger, A. M. Kollmeier, C. Bohm, R. E. Kontermann, U. K. Teichgraeber, A. Fahr and I. Hilger (2017). "A fast and effective determination of the biodistribution and subcellular localization of fluorescent immunoliposomes in freshly excised animal organs." BMC Biotechnol **17**(1): 8.

Tiwari, S. B. and M. M. Amiji (2006). "A review of nanocarrier-based CNS delivery systems." Curr Drug Deliv **3**(2): 219-232.

Tong, H. I., W. Kang, P. M. Davy, Y. Shi, S. Sun, R. C. Allsopp and Y. Lu (2016). "Monocyte Trafficking, Engraftment, and Delivery of Nanoparticles and an Exogenous Gene into the

Acutely Inflamed Brain Tissue - Evaluations on Monocyte-Based Delivery System for the Central Nervous System." PLoS One **11**(4): e0154022.

Torchilin, V. (2009). "Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers." Eur J Pharm Biopharm **71**(3): 431-444.

Torchilin, V. P. (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers." Nat Rev Drug Discov **4**(2): 145-160.

Torchilin, V. P., M. I. Shtilman, V. S. Trubetskoy, K. Whiteman and A. M. Milstein (1994). "Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo." Biochim Biophys Acta **1195**(1): 181-184.

van Rooy, I., E. Mastrobattista, G. Storm, W. E. Hennink and R. M. Schiffelers (2011). "Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain." J Control Release **150**(1): 30-36.

van Tellingen, O., B. Yetkin-Arik, M. C. de Gooijer, P. Wesseling, T. Wurdinger and H. E. de Vries (2015). "Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment." Drug Resist Updat **19**: 1-12.

Vieira, D. B. and L. F. Gamarra (2016). "Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier." Int J Nanomedicine **11**: 5381-5414.

Voinea, M. and M. Simionescu (2002). "Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs." J Cell Mol Med **6**(4): 465-474.

von Bartheld, C. S., D. E. Cunningham and E. W. Rubel (1990). "Neuronal tracing with Dil: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis." J Histochem Cytochem **38**(5): 725-733.

Wong, H. L., X. Y. Wu and R. Bendayan (2012). "Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics." Adv Drug Deliv Rev **64**(7): 686-700.

Xu, F., W. Lu, H. Wu, L. Fan, X. Gao and X. Jiang (2009). "Brain delivery and systemic effect of cationic albumin conjugated PLGA nanoparticles." J Drug Target **17**(6): 423-434.

Yamashita, F. and M. Hashida (2013). "Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **65**(1): 139-147.

Yao, S. T. and C. N. May (2013). "Intra-carotid angiotensin II activates tyrosine hydroxylase-expressing rostral ventrolateral medulla neurons following blood-brain barrier disruption in rats." Neuroscience **245**: 148-156.

Zehendner, C. M., L. Librizzi, M. de Curtis, C. R. Kuhlmann and H. J. Luhmann (2011). "Caspase-3 contributes to ZO-1 and Cl-5 tight-junction disruption in rapid anoxic neurovascular unit damage." PLoS One **6**(2): e16760.

Zhang, T. T., W. Li, G. Meng, P. Wang and W. Liao (2016). "Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier." Biomater Sci **4**(2): 219-229.

11 ANEXO



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 327 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Lipossomas como carreadores de fármacos para uso no sistema nervoso central”, que tem como responsável Andre Ricardo Massensini, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 27/10/2015. Este certificado espira-se em 27/10/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 327 / 2015, related to the Project entitled “Liposomes for central nervous system drug delivery”, under the supervision of Andre Ricardo Massensini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 27/10/2015. This certificate expires in 27/10/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 27/10/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br