

Desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o transporte cerebral de microRNAs e sua aplicação na doença de Alzheimer

Development of therapeutic strategies for cerebral transport of microRNAs and its application in Alzheimer's disease

Susana Helena Fernandes Rodrigues¹, Ana Rita Ramalho Figueiras^{1*}

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

*rfigueiras@ff.uc.pt

RESUMO

Ao longo das duas últimas décadas, um dos maiores desafios na pesquisa científica na área da saúde tem sido compreender as causas da doença de Alzheimer, com o intuito de desenvolver terapêuticas seguras e efetivas. Apesar das terapêuticas atuais para o tratamento da doença de Alzheimer proporcionar o alívio sintomático e a melhoria da função cognitiva, estas não permitem retardar a progressão a longo termo da doença, tendo como consequências efeitos severos para o doente. Neste sentido, é urgente desenvolver novas estratégias para melhorar a eficácia, o transporte através da Barreira Hematoencefálica, a biodisponibilidade, e consequentemente reduzir os efeitos secundários dos fármacos para o tratamento das doenças neurodegenerativas. Os microRNAs acoplados às novas tecnologias representam uma estratégia promissora não só como uma possível solução para o tratamento da doença de Alzheimer mas também como meio de diagnóstico, abrindo caminhos para identificar a doença em estádios precoces e parar ou abrandar a sua progressão em benefício do doente, familiares e sociedade, em geral.

Palavras-chave: Alzheimer; Barreira Hematoencefálica; biodisponibilidade; sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Over the last two decades, one of the biggest challenges in scientific research in healthcare has been to understand the causes of Alzheimer's disease in order to develop safe and effective therapies. The current therapies for the treatment of Alzheimer provide symptomatic relief and improvement of cognitive function, but do not slow the long term progression of the disease and thus have severe consequences for the patient. So it is urgent to develop new strategies to improve the effectiveness, the transport across the blood brain barrier, the bioavailability and consequently to reduce the side effects of drugs for the treatment of neurodegenerative diseases. MicroRNAs coupled with new technologies represent a promising strategy not only as a possible solution for the treatment of Alzheimer's disease but also as a diagnostic tool, opening ways to identify the disease on early stages and stop or slow down its progression for the benefit of the patient, the family and the society, in general.

Keywords: Alzheimer; bioavailability; drug delivery systems; Hematoencephalic Barrier.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer afeta milhões de pessoas no mundo. Com a crescente preocupação com o envelhecimento populacional, têm sido feitos investimentos socioeconômicos e médicos de grande impacto.

O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva, irreversível, caracterizada pela perda de funcionalidade dos neurónios, diminuição da comunicação entre eles e por fim pela morte celular, resultando na perda de memória e das capacidades cognitivas. A forma mais comum de Alzheimer é a tardia, que afeta pessoas com idade superior a 65 anos. No entanto, alguns casos esporádicos de Alzheimer são precoces e afetam pessoas entre os 30 e 60 anos. A progressão da doença é acompanhada por alterações comportamentais como agressão, depressão, alucinação, ilusão, raiva e agitação. Eventualmente, progride para demência, deficiência física e culmina com a morte (ANDERSON; HOFFMAN, 2013).

A terapêutica atualmente existente, reporta aos inibidores da colinesterase (ICE) que permitem compensar a depleção da acetilcolina, a qual está associada à aprendizagem e memória. A Tacrina, um ICE reversível, foi o primeiro fármaco a surgir para o tratamento da Alzheimer. No entanto, devido à sua hepatotoxicidade e outros efeitos secundários associados, raramente é utilizado. Novos fármacos foram desenvolvidos, a segunda geração de ICE inclui a Rivastigmina, a Galantamina e o Donepezilo. O Donepezilo, é um ICE seletivo, tem semi-vida mais longa e tem demonstrado efeitos quer num estado precoce quer num estado mais avançado da doença. Também é recorrente o uso de antagonistas parciais do N-metil-D-aspartato, como a Memantina, em estados mais avançados. Outras terapêuticas poderão ser associadas, entre as quais, os antidepressivos, os ansiolíticos e antipsicóticos, que ajudam a gerir as manifestações comportamentais. Apesar destes tratamentos proporcionarem uma melhoria das funções cognitivas e do desempenho das atividades diárias, não interferem diretamente nos mecanismos patológicos subjacente à doença.

Posto isto, é urgente reunir esforços para um melhor entendimento do mecanismo desta patologia e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e novos meios de diagnóstico, que permitam não só tratar a sintomatologia e retardar a progressão da doença como também interferir na cura e prevenção da mesma. Impedindo desta forma o aumento exponencial do número de doentes com

Alzheimer.

1. Doença de Alzheimer

Em 1906 o neurologista e psiquiatra Dr. Alois Alzheimer, descreveu o caso de uma mulher de 52 anos que apresentava problemas de compreensão e memória, desorientação, incapacidade de falar, problemas comportamentais e alucinações. Após a sua morte examinou o cérebro e descreveu dois marcadores da doença de Alzheimer (DA): aglomerados de proteínas (placas β -amilóide) entre os neurónios e emaranhados neurofibrilares dentro dos neurónios. Só mais tarde, em 1960, a DA foi reconhecida como uma doença distinta e não como uma consequência do processo de envelhecimento normal.

O cérebro humano é composto por muitas partes em que cada uma delas é responsável por determinadas funções específicas. Existem biliões de neurónios, os quais são constituídos pelo corpo celular, o axónio e dendrites. O corpo celular contém o núcleo que controla grande parte das atividades celulares. O axónio é responsável por transmitir mensagens entre os neurónios, através da camada de mielina que o cobre e que aumenta a velocidade de transmissão de sinal no cérebro. As dendrites recebem as mensagens provenientes dos axónios de outros neurónios. São esses sinais, mensagens químicas ou elétricas que permitem o cérebro receber e processar informação, fazer ajustes e enviar instruções para as diferentes partes do corpo humano. A comunicação em conjunto com o processo de metabolismo e de reparação celular, deve funcionar muito bem, não só para a manutenção da funcionalidade dos neurónios, mas também para a sobrevivência de todo o organismo.

Num adulto não é comum haver reposição de neurónios quando estes morrem. Com o envelhecimento ocorrem mudanças em todo o organismo incluindo o cérebro. Nomeadamente, redução da comunicação entre neurónios devido à degradação ou perda da mielina, redução do fluxo sanguíneo por estreitamento das artérias, danos causados pelo aumento de radicais livres e inflamações, aparecimento de placas β -amilóide e emaranhados fora e dentro da célula, respetivamente. Contudo, as pessoas podem adotar atitudes que auxiliam na preservação de um envelhecimento saudável do cérebro. Entre as quais se destaca: o controlo de fatores de risco de doenças crónicas, como a diabetes, prática regular de exercício físico, manutenção de uma

dieta saudável, realização de atividades que estimulem a cognição e a manutenção de relações sociais.

Nos cérebros de doentes com Alzheimer existem com grande abundância duas estruturas, as placas β -amilóide e os emaranhados neurofibrilares. As placas β -amilóide são formadas a partir de uma proteína precursora amiloide (PPA) que está ligada à membrana celular.

As enzimas responsáveis pela clivagem da PPA são, a α -secretase, a β -secretase e a γ -secretase. Dependendo das enzimas envolvidas e do segmento da PPA onde a clivagem ocorre, o processamento da PPA pode seguir por dois mecanismos diferentes com diferentes consequências. Quando é a α -secretase a clivar a porção da PPA que tem potencial para se tornar em β -amilóide, um fragmento (sPPA α) é libertado. Este tem propriedades benéficas ao promover o crescimento e sobrevivência neural. A porção restante da PPA é depois clivada pela γ -secretase.

No mecanismo prejudicial, é a β -secretase que cliva em primeiro lugar a molécula PPA numa extremidade do peptídeo β -amilóide, libertando o fragmento sPPA β . Este fragmento liga-se a outros peptídeos β -amilóide formando agregados solúveis que se tornam cada vez maiores. Quando outras proteínas e material celular se combinam com estes agregados formam entidades insolúveis chamadas placas, que são características da DA. Os emaranhados neurofibrilares têm origem na disfunção da proteína *Tau*. Esta proteína tem como funcionalidade estabilizar os microtúbulos que suportam os neurónios e ajudam no transporte de nutrientes e outros componentes celulares, como os neurotransmissores. No entanto, esta só se liga aos microtúbulos quando tem um determinado número de moléculas de fosfato acopladas.

Na DA, um número abundante de moléculas de fosfato ligam-se à proteína *Tau* ficando esta hiperfosforilada. A proteína *Tau* deixa de se conseguir ligar aos microtúbulos, os quais desintegram-se, interrompendo o transporte celular, aglomerando-se com outras proteínas *Tau* e consequentemente formando os emaranhados neurofibrilares. Nestas circunstâncias, a comunicação e/ou entre neurónios e outras estruturas/células fica comprometida, resultando na eventual morte dos neurónios (NATIONAL INSTITUTE ON AGING, 2008).

Dentre a procura das causas da DA encontram-se os fatores genéticos. Estão associados a um histórico familiar, com a presença de mutações nos cromossomas 21, 14 e 1, as quais provocam uma produção anormal da

proteína β -amilóide. A alteração genética, no gene que codifica a APOE, proteína transportadora do colesterol, localizado no cromossoma 19 parece também estar associada ao aparecimento da doença de Alzheimer tardia. Outros fatores tais como o stress oxidativo e os processos inflamatórios, parecem estar envolvidos na doença. Todavia, a verdadeira causa da DA não está ainda perfeitamente esclarecida. É ainda necessário salientar que permanece desconhecido se estes fatores e as estruturas referidas anteriormente serão a causa da doença, ou se serão apenas uma consequência do processo da DA.

2. MicroRNAs

2.2. Definição e estrutura

Nas células eucarióticas, os ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) são intermediários da expressão génica. Estes compostos são sintetizados e processados no núcleo, e posteriormente transportados através de complexos do poro nuclear, situados na membrana nuclear, para o citoplasma. Em alguns casos podem ser transportados para áreas específicas do citoplasma antes de serem traduzidos nos ribossomas. Cada um destes processos fundamentais é levado a cabo por complexos macromoleculares compostos por várias proteínas e por vezes, também por ácidos ribonucleicos (RNAs). No entanto, muita informação acerca da estrutura, operação e regulação destas estruturas moleculares, bem como as interações intercelulares que regulam a atividade dos fatores de processamento de RNA, continuam a ser desconhecidos.

Os micro ácidos ribonucleicos (miRNAs) foram descobertos durante a clonagem e análise de genes, verificando-se que alguns genes não codificavam produtos proteicos mas outros RNAs. As partículas de miRNA caracterizam-se por serem formadas a partir do processamento de RNAs precursores, contendo aproximadamente 70 nucleótidos, que formam uma estrutura em ansa que contém erros de emparelhamento. Para a produção de miRNAs utilizando estes precursores é necessário uma ribonuclease, a Dicer, que cliva o RNA de cadeia dupla. Desta clivagem resulta um intermediário de RNA de cadeia dupla, em que cada cadeia contém entre 20 a 25 nucleótidos.

No início da transcrição, os processos de regulação são o principal mecanismo de controlo da expressão génica. Porém, existem outros mecanismos de controlo pós-transcricional que operam no citoplasma, controlando a estabilidade

e a localização do mRNA, bem como a sua tradução em proteínas. Os miRNAs podem atuar nas duas fases de regulação da expressão gênica. A regulação transcricional é mediada pela associação de uma das cadeias miRNA ao complexo silenciador da transcrição induzido por RNA, conduzindo-o aos genes alvo. Sendo a transcrição destes, reprimida pela modificação da cromatina, mediante metilação das histonas, conduzindo à formação de heterocromatina. O mecanismo pós-transcricional (fig.1), o qual tem sido objeto de um estudo mais intensivo, decorre da associação de uma das cadeias de miRNA a múltiplas proteínas para formar um complexo silenciador induzido por RNA (CSIR), que tem como alvos os mRNAs homólogos. Quando o RNA-RISC forma um híbrido com o mRNA alvo com alguns emparelhamentos imprecisos, uma vez que a ligação das bases do miRNA com as do mRNA-alvo na região 3' não-traduzida não é exatamente complementar, ocorre uma repressão da tradução (LODISH; MATSUDAIRA, 2006).

Certos mRNAs estão localizados nas sinapses entre os neurônios. A regulação da tradução desses mRNAs parece estar relacionada com a formação e manutenção dessas mesmas sinapses e pode ter influência no processo de aprendizagem (COOPER; HANSMAN, 2007).

2.3. Aplicação na doença de Alzheimer

Estudos recentes sugerem que um determinado número de miRNAs encontram-se desregulados na condição da doença de Alzheimer ou alterações nestes podem contribuir para o risco do seu aparecimento e desenvolvimento. Inclusive, alguns deles estão implicados nos processos inflamatórios, oxidativos e pro-apópticos, bem como na regulação de genes chave, nomeadamente, APP e β -secretase. Polimorfismos específicos da DA foram identificados, verificando-se que incluíam regiões de 3'-não traduzidas correspondentes à APP e β -secretase, as quais são alvos para determinados miRNAs.

De seguida serão expostos exemplos de miRNAs que têm sido investigados e que estão associados a esta patologia, de diferentes formas.

2.3.1. miRNA-29

Estudos revelam que é um fator importante na homeostase neural. Atua como inibidor da apoptose neural, uma vez que tem como alvo a família de moléculas reguladoras pro-apópticas.

A desregulação deste miRNA no cérebro provoca um aumento desses marcadores

apópticos na DA. Também foi demonstrado que o miRNA-29 tem como alvo a β -secretase, e que a sua sobre-expressão resulta numa diminuição desta enzima e concomitantemente na produção de peptídeos β -amilóide. Porém alguns resultados reflectem a existência de diferentes níveis de expressão gênica (sob/sobre-expressão) destes miRNAs, em regiões específicas de determinado tecido.

Estas observações salientam a importância de considerar diferentes metodologias nos estudos realizados. Enquanto alguns investigadores usam a hibridização *in situ* para medir a expressão gênica, outros usam PCR em tempo-real, o qual está mais suscetível a vieses, uma vez que requer uma amplificação do processo em vez de uma medida direta (DELAY; MANDEMAKERS; HÉBERT, 2012).

2.3.2. miRNA-101

Pesquisas efetuadas permitiram verificar que a sob-expressão do miRNA-101 contribui para a patologia da DA de três formas distintas: pelo aumento da expressão da APP, pela formação de emaranhados neurofibrilares através do aumento da fosforilação da tau, e por último, permitindo a sobre-expressão da COX-2, contribuindo para o aumento da resposta inflamatória (DELAY; MANDEMAKERS; HÉBERT, 2012).

De salientar a existência de polimorfismos genéticos que podem afetar a ligação dos miRNAs aos seus mRNAs alvos, quer pela perda ou pelo aumento da ligação entre estes, podendo resultar em consequências graves e representando um possível fator de risco para o desenvolvimento de determinadas doenças, nomeadamente a DA.

3. Transporte cerebral de microRNAs

O cérebro é um órgão fundamental no nosso organismo e também um dos mais delicados. Encontra-se protegido pela Barreira Hematoencefálica (BHE), que constitui um sistema biológico complexo, responsável por criar um ambiente restrito e controlado necessário à sua sobrevivência. Apesar de ser um meio de proteção contra a entrada de substâncias tóxicas no cérebro, a passagem de moléculas ou especificamente fármacos que têm como objetivo o tratamento de doenças que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) ficará igualmente comprometida.

3.1. Mecanismos

A BHE é uma estrutura dinâmica,

constituída por células endoteliais unidas pelas junções *tight*, que são responsáveis pela baixa permeabilidade do endotélio. As células endoteliais encontram-se rodeadas e suportadas por outras células, nomeadamente, periócitos, astrócitos e células microglia, que auxiliam na manutenção da funcionalidade desta barreira. Juntamente com as enzimas presentes nas células endoteliais, o transporte efetuado pela BHE fica assim condicionado quer a nível físico, quer a nível metabólico (BRASNJEVIC et al., 2009).

Porém, o cérebro requer substâncias essenciais ao seu metabolismo e normal funcionamento como a glucose, insulina, hormona de crescimento, entre outras. Estas circulam entre o sangue e o cérebro, através de mecanismos de transporte fisiológicos, inerentes à manutenção da homeostase do cérebro.

Em condições de normal funcionamento da BHE, os principais mecanismos de transporte entre o sangue e o cérebro são os seguintes (fig.2):

- **Transporte ativo:** mecanismo mediado por transportadores expressos no espaço luminal (contacto com o sangue) e basal (contacto com o meio interno cerebral). Este processo envolve a formação de poros transitórios muito estreitos, que permitem apenas a passagem de moléculas específicas de substrato do respetivo transportador.

- **Endocitose mediada por recetores específicos:** este processo ocorre pela ligação do ligando ao recetor, que se localiza na membrana luminal, induzindo uma alteração no mesmo e desencadeando a endocitose. A endocitose é caracterizada pela invaginação da membrana originando vesículas que contém os complexos a transportar. Estas vesículas transformam-se num complexo lisossomal com pH ácido, no qual ocorre a dissociação entre o ligando e o recetor. Uma vez livre, o recetor é reciclado para a superfície celular ou degradado em proteossomas. As vesículas contendo o substrato são transportadas através do citoplasma da célula endotelial até à membrana basal, com a qual se difundem, resultando na exocitose.

- **Endocitose por adsorção:** este mecanismo consiste na endocitose de substâncias com carga positiva (moléculas catiónicas), diferenciando-se do anterior

por não necessitar de recetores específicos. Segundo Gonatas e colaboradores (1984), a ligação à membrana luminal ocorre por meio de interações eletrostáticas entre as cargas positivas do soluto e as regiões da superfície da membrana plasmática carregadas negativamente. O processo subsequente é semelhante à endocitose mediada por recetores específicos.

- **Difusão passiva:** baseia-se no movimento de substâncias, entre o compartimento exterior e o interior das células, em função do seu gradiente de concentração. É possível distinguir dois processos:

- **Paracelular:** consiste na difusão de pequenas moléculas hidrofílicas pela BHE, através das junções *Tight*.

- **Transcelular:** processo em que as moléculas lipofílicas conseguem entrar na célula endotelial, dissolvendo-se nos lípidos da membrana plasmática.

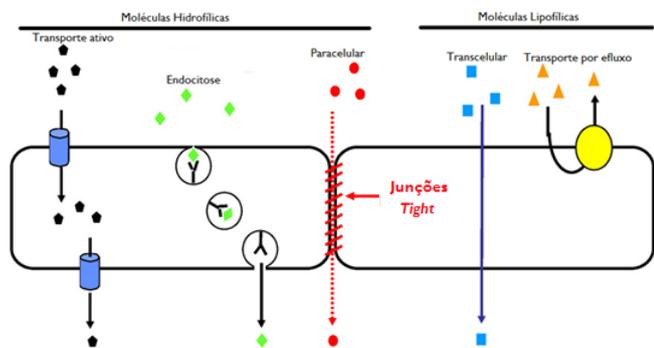
- **Transporte por efluxo:** mecanismo subjacente à atividade de uma bomba de efluxo, responsável pelo transporte de substratos para o exterior das células endoteliais. Podem ser dependentes ou independentes de energia. A glicoproteína P representa um dos sistemas de transporte ativo por efluxo mais importantes e mais investigado. Uma possível explicação para a acumulação de placas β - amiloide no tecido cerebral, que é característica da patologia de Alzheimer, parece estar relacionada com o aumento da expressão da glicoproteína P nos vasos sanguíneos (LAM et al., 2001; VOLGELGESANG et al., 2002).

Estes mecanismos de transporte biológicos assumem-se como possíveis vias para veicular fármacos com sucesso para o SNC. Os fármacos podem ser modelados em função destes ou acoplados a ligandos que serão reconhecidos por recetores expressos na BHE.

No entanto, devido ao próprio processo patológico, outros fatores podem condicionar

a biodisponibilidade dos fármacos, os quais devem ser considerados no desenvolvimento de uma nova estratégia para que esta seja bem-sucedida.

Figura 1: Representação esquemática dos diversos transportes de moléculas através da BHE.



Fonte: Adaptada de GABATHULER (2010).

3.2. Limitações

No mecanismo de endocitose mediado por recetores, nem todas as vesículas são internalizadas, e as que entram na célula podem seguir uma via que resultará na sua destruição com a consequente degradação do substrato (BROADWELL; BALIN; SALCMAN, 1988).

A passagem por difusão passiva depende do tamanho molecular (< 500 D), da carga iónica e da lipossolubilidade (quanto mais lipofílico mais fácil será o transporte). Contudo, o aumento da lipossolubilidade da molécula para melhorar o transporte, pode traduzir-se numa maior afinidade para a bomba de efluxo, a glicoproteína P, e para outras membranas biológicas. Consequentemente, a distribuição plasmática do fármaco é afetada, aumentando a depuração plasmática e diminuindo a área sobre a curva da concentração plasmática do mesmo versus o tempo.

As principais limitações relacionadas com a entrega de fármacos ao cérebro encontram-se resumidas na seguinte tabela 1:

Table I - Physicochemical properties of α -CD, β -CD and γ -CD. Adapted from AHUJA, A. [et al.] (19).

Características do fármaco	Características da BHE	Fatores periféricos
Peso molecular	Composição	Afinidade
Gradiente de concentração	lipídica	para
Lipossolubilidade	Carga da membrana	proteínas plasmáticas

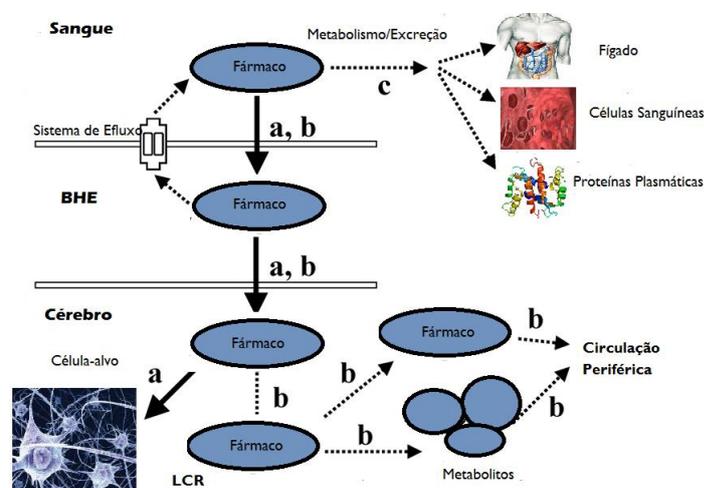
Carga molecular	Presença de sistemas de transporte	Estabilidade enzimática
Estrutura tridimensional	Existência de condições patológicas	Fluxo sanguíneo
Afinidade para os transportadores		Taxa de depuração

Assim, três situações de transporte e entrega de fármacos através da BHE poderão surgir (fig.3):

- O fármaco passa a BHE (se não for reencaminhado de volta para o sistema sanguíneo por transportadores de efluxo ou metabolizado por enzimas celulares) e segue pelo espaço extracelular até à célula alvo, diretamente ou através do líquido céfalo-raquidiano (LCR)
- O fármaco não chega ao tecido alvo depois de ter passado com sucesso a BHE devido a metabolização enzimática ou depuração.
- O fármaco não alcança o alvo terapêutico ao ligar-se às proteínas plasmáticas ou às células sanguíneas na circulação periférica, sendo metabolizado ou secretado por outros órgãos, como o fígado e os rins, respetivamente.

Estratégias para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte e entrega de fármacos devem ser otimizadas com base na situação "a" evitando as outras duas situações.

Figure 2 - Mecanismos de transporte e entrega de fármacos através da BHE.



Fonte: Adaptada de BRASNJEVIC et al., 2009

4. Estratégias terapêuticas para a administração cerebral de microRNAs

Os mecanismos convencionais de entrega de fármacos para o cérebro têm-se mostrado insuficientes, surgindo a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas. Estas estratégias podem ser invasivas ou não invasivas.

4.1. Estratégias invasivas

4.1.1. Infusão intra-cerebro-ventricular

Este mecanismo envolve a administração de substâncias no LCR. A difusão através do parênquima cerebral é muito lenta e inversamente proporcional ao tamanho das moléculas. Para além disso, as moléculas podem movimentar-se livremente entre o LCR e os fluidos extracelulares do parênquima cerebral. Assim, este método teoricamente apenas resultará em terapêuticas que utilizam elevadas concentrações de fármaco (PATEL et al., 2009). A não ser que o alvo terapêutico esteja próximo da intervenção. Este é um método pouco eficiente na entrega de fármacos.

Infusão cerebral via cateter

Este procedimento envolve a inserção de um cateter de pequeno calibre no cérebro, ligado a uma bomba que regula o fluxo da infusão para o parênquima cerebral e para o espaço intersticial. O sucesso deste processo depende da correta colocação do cateter e dos parâmetros da própria infusão. Isto é, a distribuição no cérebro por difusão diminui exponencialmente com a distância e para, além disso, algumas áreas são de difícil saturação devido ao constante fluxo sanguíneo, pelo que é necessário realizar uma injeção muito precisa do fármaco (VANDERGRIFT et al., 2006).

Inserção de implantes

As inserções de implantes, que consistem num reservatório de fármaco, têm como funcionalidade proporcionar uma libertação uniforme de substâncias por um longo período de tempo. Este método revela-se vantajoso relativamente aos anteriores ao permitir reduzir o desconforto e o stress dos doentes submetidos a tais intervenções (PATEL et al., 2009). Outras vantagens prendem-se com o facto de a distribuição do fármaco não ser tão lenta como no LCR e a pressão intracraniana não ser alterada pela infusão de pequenos volumes, como referido no método anterior. Contudo, a sua colocação deve ser precisa para ser eficaz e ultrapassar os problemas associados à difusão de fármacos no parênquima cerebral.

Manipulação da BHE

A alteração do normal funcionamento da BHE através da modulação das junções *tight* pode facilitar a entrega de fármacos no cérebro. Porém, tais alterações devem ser transitórias e reversíveis de modo a evitar a passagem de moléculas altamente tóxicas, que poderão causar danos cerebrais. As alterações podem ser realizadas por diferentes processos, nomeadamente:

- **Processo osmótico:** o choque osmótico facilita a passagem de fármacos hidrossolúveis, através da indução de um meio hipertónico que leva ao encolhimento das células endoteliais e consequentemente provoca a disfunção das junções *tight*. Alguns investigadores estudaram o uso do manitol como agente hiperosmótico. No entanto, verificaram a existência de fatores de risco associados, tais como a passagem de proteínas plasmáticas, que alteram a captação da glucose, entre outros (MILLER, 2002).
- **Processo Bioquímico:** as infusões de substâncias vasoativas, como a bradicinina, foram investigadas como indutoras da permeabilidade das junções *tight*. Contudo, os ensaios foram abandonados devido aos danos causados nas regiões em que a BHE sofreu alteração. Outros estudos, verificaram ainda que o uso de solventes, como o laurilsulfato de sódio, de estabilizadores e adjuvantes na formulação de fármacos podem inadvertidamente levar ao rompimento da BHE (SAIJA et al., 1997). Uma outra estratégia que tem vindo a ser alvo de estudo é a administração sistémica de alquilgliceróis. Evidências sugerem que o aumento da permeabilidade da BHE é causada pelo colapso temporário das junções *tight*, e que é dependente do comprimento do grupo alquil e do número de gliceróis presente na estrutura (ERDLENBRUCH et al., 2000). Contudo, o mecanismo ainda não está totalmente conhecido, no entanto sabe-se que a resposta é dependente da concentração e da estrutura, sugerindo que existe uma interação com os recetores localizados nos microvasos.
- **Ultrassom:** evidências experimentais têm demonstrado que esta técnica pode levar ao rompimento seletivo da BHE no cérebro. Contudo, o recurso à sonificação de elevada intensidade tem vindo a ser

associada a danos localizados no tecido cerebral e a alterações na função neural sem efeitos estruturais e funcionais a longo prazo. Com o propósito de reduzir a intensidade do ultrassom, tem sido desenvolvido um novo método em que a exposição às pulsações sonificadas é precedida pela injeção na corrente sanguínea de um agente de contraste de ultrassom. Este agente consiste em microbolhas preformadas que em conjunto com as ondas ultrassônicas podem resultar em três situações distintas:

- Alongamento mecânico da parede vascular e consequentemente abertura das junções *tight*;
- Redução do fluxo sanguíneo e indução de uma isquemia transitória, que pode levar ao aumento da permeabilidade da BHE;
- As microbolhas podem colapsar durante a sonificação, causando um choque localizado de ondas e confluência de fluidos, tendo como resultado a abertura mecânica da BHE.

Em suma, as abordagens invasivas podem ser uma alternativa terapêutica, mas não são a estratégia mais promissora por diversos motivos, entre os quais o facto de serem dispendiosas, requererem anestesia e, por conseguinte hospitalização, além disso causam um grande desconforto ao doente, diminuindo a adesão terapêutica.

4.2. Estratégias não-invasivas

4.2.1. Profármacos Transportadores coloidais

Os profármacos constituem uma estratégia não invasiva, de natureza química e são compostos por substâncias farmacologicamente inativas, as quais resultam de uma modificação transitória das moléculas originais. A modulação e o uso de profármacos têm o intuito de contornar problemas farmacocinéticos e de disponibilidade associados às moléculas originais. Esta estratégia permite não só aumentar a permeabilidade membranar, mas também a afinidade e a lipossolubilidade, recorrendo a técnicas como a amidação e a esterificação, facilitando a entrada no cérebro e prolongando o seu tempo de retenção. No local de ação as substâncias inativas são convertidas por reação química ou enzimática

em compostos fisiologicamente ativos.

No entanto, o aumento de lipossolubilidade, também aumenta a afinidade para outros tecidos e membranas biológicas, diminuindo a concentração do fármaco no local de ação. Esta fraca seletividade associada com as extensas metabolizações a que estão sujeitos e que levam à formação de moléculas reativas, reduz o efeito terapêutico para o qual o profármaco foi desenhado e podem resultar em efeitos tóxicos. Recentemente, têm sido feitas abordagens no sentido de direcionar estes profármacos para transportadores de membrana específicos, como os transportadores de aminoácidos e da glucose.

4.2.2. Transportadores coloidais

O desenvolvimento de sistemas coloidais baseia-se na preparação de veículos que permitem a modulação das propriedades físico-químicas dos fármacos, de modo a dirigi-los para alvos específicos, aumentando a seletividade, e protegendo-os da degradação enzimática. Estas partículas transportadoras, através do controlo do tamanho e do potencial zeta, proporcionam ainda um aumento da permeabilidade membranar e da biodisponibilidade. Desta forma, a eficácia é melhorada e os efeitos secundários são reduzidos. Dos principais sistemas coloidais fazem parte os lipossomas, as micelas e as nanopartículas.

Lipossomas

Os lipossomas são vesículas concêntricas formadas por bicamadas lipídicas, que delimitam um volume aquoso. Essas camadas são compostas por lípidos biodegradáveis e biocompatíveis, semelhantes às membranas biológicas. As propriedades biofísicas dos lipossomas, tais como o tamanho, a carga à superfície, a composição lipídica e a quantidade de colesterol variam e permitem controlar a distribuição, a absorção pelos tecidos e a entrega de fármacos. Os lipossomas podem ser preparados com diâmetros entre 20 nm e 100µm. São classificados de acordo com o tamanho e o método de preparação (BRASNJEVIC et al., 2009).

Estas partículas são rapidamente eliminadas pelo fígado e pelos macrófagos. No entanto, o tempo de semi-vida pode ser aumentado se algumas substâncias forem adicionadas como o polissorbato-80 e o polietilenoglicol (PEG), à dupla camada lipídica. Desta forma, os lipossomas ficam mais estáveis e

difícilmente serão reconhecidos pelos macrófagos.

Por serem de natureza lipofílica, os lipossomas apresentam níveis favoráveis de permeabilidade da BHE, o que os torna bons candidatos a veículos de entrega de fármacos para o SNC. Estudos realizados indicam que os fármacos transportados por lipossomas atravessam a BHE por difusão ou endocitose. Contudo, o mecanismo exato, ainda não está totalmente compreendido.

A formação de complexos de lipossomas com anticorpos ou ligandos que serão reconhecidos por recetores da superfície celular alvo, torna-se vantajosa por direcionar seletivamente os fármacos para as células alvo e concomitantemente diminuir os efeitos tóxicos nas células saudáveis. Traduzindo-se, numa entrega efetiva sem interferir com os locais naturais de ligação aos recetores e ultrapassando o problema da competição.

Dependendo da natureza do fármaco que se pretende veicular, este pode ser inserido no compartimento interno, de natureza hidrofílica ou na bicamada fosfolipídica, se for hidrossolúvel ou lipossolúvel, respetivamente.

Grande parte das estratégias terapêuticas para entrega de fármacos ao cérebro, utilizando lipossomas ainda se encontram em ensaios experimentais. Com aplicação na DA foi estudada a veiculação de pequenas sequências β -amilóide através dos lipossomas como método de imunização, verificando-se a indução de uma resposta imune com produção de Imunoglobulina G. (ROCHA, 2013). Outros estudos recentes têm demonstrado que a encapsulação de plasmídeos e oligonucleotídeos pelos lipossomas, permite atravessar a bicamada fosfolipídica, e alguns lipossomas catiónicos protegem os oligonucleotídeos da degradação pelas nucleases facilitando a sua absorção (ZHANG; SHYKIND; SUN, 2013).

Micelas

As micelas são formadas mediante auto-organização espontânea de copolímeros em bloco (5-50nm), de natureza anfífilas, quando em solução aquosa. Os blocos hidrofílicos estabelecem ligações de hidrogénio com o meio aquoso, formando um invólucro estanque à volta do núcleo micelar. O núcleo é hidrofóbico e é o local onde a maioria dos fármacos hidrofóbicos são encapsulados, permitindo a sua proteção contra a hidrólise e a degradação enzimática. Além disso, a superfície das micelas, devido à sua natureza hidrofílica, retardada o seu reconhecimento pelo sistema reticulo-endotelial, e, por conseguinte, a eliminação prévia das micelas

a partir da corrente sanguínea (TIWARI et al., 2012).

O facto de a composição química, o peso molecular e o comprimento dos blocos poder ser facilmente alterados, permite o controlo do tamanho e da morfologia das micelas.

Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) são transportadores compostos por polímeros sintéticos e semi-sintéticos, que podem apresentar um tamanho que varia entre 1 e 1000 nm. Podem-se subdividir em dois tipos: nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas de nanopartículas constituídos por um núcleo sólido, com uma matrix polimérica densa, enquanto as nanocápsulas são formadas por um envelope polimérico fino que recobre uma cavidade oleosa.

As nanopartículas poliméricas comparativamente com outros transportadores coloidais apresentam elevada estabilidade quando em contacto com os fluidos biológicos. O uso de materiais biodegradáveis na sua preparação permite sustentar a libertação do fármaco no local de ação por um período de dias ou até semanas após a sua administração. As nanopartículas podem ser preparadas por diferentes técnicas e materiais. O recurso a polímeros naturais permite evitar os problemas de toxicidade associados aos polímeros sintéticos (TIWARI et al., 2012).

A melhoria da biodisponibilidade e/ou da eficácia associada a estes sistemas de entrega de fármacos pode representar uma solução para contornar os obstáculos ao tratamento das doenças neurodegenerativas, inclusive a doença de Alzheimer. É recorrente o uso de polissorbato 80 e do PEG, de igual modo como nos lipossomas, que permitem alterar a farmacocinética e a biodisponibilidade das NPs. Alguns estudos demonstraram que as NPs podem ser absorvidas pelo cérebro *in situ* e *in vivo* sem alterações significativas da integridade ou permeabilidade da BHE. Todavia, o mecanismo exato de transporte não é conhecido, mas a ausência de toxicidade na BHE sugere que as NPs possam ser transportadas através da BHE por endocitose e/ou por transcitose ou difusão passiva, dependendo do tamanho das partículas, da composição do material e da estrutura. Em alguns casos, é relatado que são desenhadas para imitar moléculas que normalmente seriam transportadas para o cérebro, como por exemplo, as lipoproteínas de baixa densidade.

Um dos fármacos testados, veiculados por NPs, foi a Tacrina, um ICE. Recorrendo ao

polissorbato 80 e à injeção intravenosa, verificou-se uma melhoria da concentração do fármaco no cérebro. Outro exemplo foi o transporte da Coenzima Q₁₀ em NPs usando o quitosano, polímero biodegradável. Foi demonstrada a eficácia do uso deste polímero e da Coenzima Q₁₀, a qual provou ter capacidade para dissolver as placas senis *in vivo*, desempenhando uma ação terapêutica importante no desenvolvimento de tratamentos alternativos para a DA (SAHNI et al., 2011).

Foi ainda estudado o uso de um sistema híbrido, que combina a imagem por ressonância magnética com a microscopia por fluorescência, o qual deve ser aplicado em estudos de diagnóstico da DA *in vivo*. Demonstrando-se desta forma, que o recurso a NPs magnético-fluorescentes pode ser considerado uma aplicação útil como biomarcador seletivo na detecção de placas β -amiloide derivadas de diferentes proteínas amiloidogénicas, que provocam doenças neurodegenerativas (SAHNI et al., 2011).

CONCLUSÃO

O sucesso das tecnologias atualmente disponíveis para o transporte de fármacos para o SNC está limitado à baixa distribuição no parênquima cerebral. É necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, capazes de transportar moléculas através das células endoteliais da BHE. Permitindo, assim, uma distribuição homogênea dos agentes terapêuticos no cérebro, proporcionando uma exposição rápida e uniforme nas células cerebrais. Para um transporte eficiente e bem sucedido, múltiplos fatores devem ser considerados, tais como: o peso molecular e a conformação estrutural, a carga molecular, o gradiente de concentração do fármaco, a lipossolubilidade, a afinidade para os recetores, bem como a própria dosagem e a existência de condições patológicas.

As estratégias não invasivas nas quais se incluem os sistemas coloidais, têm-se mostrado promissoras na entrega de fármacos ao SNC e como meios de diagnóstico. Por serem biocompatíveis, biodegradáveis e proporcionarem um aumento da biodisponibilidade dos fármacos transportados, constituem uma alternativa a desenvolver.

As NPs, em particular, têm demonstrado ser um transportador efetivo de fármacos através da BHE para o tratamento da DA. Permitem ainda, simplificar as tomas diárias da polimedicação a que os doentes de Alzheimer estão sujeitos, aumentando a adesão à terapêutica. No entanto,

uma otimização generalizada desta estratégia é essencial, no sentido de melhorar a efetividade, a especificidade e a segurança. A ação destas partículas não é exatamente previsível, na medida em que após a passagem através da BHE é igualmente importante avaliar se atividade biológica é mantida. A avaliação da segurança e dos efeitos tóxicos destas estratégias devem ser considerados, compreendidos e solucionados previamente à sua aplicação na prática clínica.

Os microRNAs têm demonstrado possuir uma ação reguladora em mecanismos subjacentes a algumas doenças, o que tem vindo a despertar o interesse pelo seu estudo na comunidade científica. Estas pequenas moléculas têm revelado ter um papel participativo e importante no controlo do desenvolvimento neural.

O envolvimento dos microRNAs na DA tem sido investigado e resultados promissores têm vindo a ser obtidos. Contudo, apesar de alguns estudos revelarem que as NPs têm potencial para manipular a expressão de microRNAs [18], ainda não existe muita informação científica disponível acerca do transporte de microRNAs para o SNC.

PERSPETIVAS FUTURAS

A administração de substâncias pela via nasal tem revelado interesse no transporte de agentes terapêuticos para o SNC. Foi demonstrada a existência de uma via direta entre o nariz e o cérebro através do epitélio olfativo e/ou dos nervos trigémiolos. A eficácia desta via está associada com a proteção do fármaco contra a degradação e/ou efluxo na cavidade nasal. No entanto, ainda existem incertezas, uma delas é se as substâncias veiculadas pelas NPs são libertadas na cavidade nasal ou se são transportadas por esta via, até ao cérebro. Outras dificuldades conhecidas são a possibilidade da irritação da mucosa nasal, a atividade enzimática e o baixo pH do epitélio nasal, bem como a possibilidade de variação dos resultados devido a patologias nasais, como o aparecimento de constipações (PATEL et al., 2009).

A imunização passiva da β -amilóide parece ser uma abordagem bastante promissora para combater a DA, com potencial para baixar os níveis das placas β -amilóide e proteger as funções cognitivas. Os anticorpos β -amilóide devem ligar-se aos pequenos agregados β -amilóide e removê-los ou prevenir a sua deposição, neutralizando os efeitos tóxicos nas sinapses. Atualmente 7 das imunoterapias passivas da DA estão em ensaios clínicos em doentes em estádios ligeiro a moderado. No entanto, verificaram-se alguns efeitos adversos. Diferentes tipos de vacinas,

meios de administração e vários adjuvantes estão a ser estudados para melhorar a segurança, a eficácia e simplificar o uso destas imunoterapias (SAHNI et al., 2011). Contudo, resultados em modelos animais, indicam que esta abordagem parece ser mais efetiva quando administrada em estádios precoces no curso da doença. Um dos maiores obstáculos na prevenção da DA através da imunização é a capacidade de identificar pessoas com risco de desenvolver a doença para além daqueles que apresentam mutações genéticas.

Atualmente, um diagnóstico definitivo da doença é feito apenas na autópsia, com base na presença dos marcadores: placas β -amilóide e filamentos neurofibrilares. A imagiologia do cérebro deve aumentar a capacidade de prever quem tem risco de desenvolver DA anos antes do início dos sintomas.

A abordagem dos microRNAs na DA e noutras doenças neurodegenerativas é muito recente e tem despertado um enorme interesse científico, na medida em que estas moléculas revelaram ter um importante papel regulatório no mecanismo da patologia da doença e por terem sido verificadas mudanças na expressão em fases anteriores ao desenvolvimento da mesma, constituindo, por isso, uma alternativa promissora como meio de deteção de doenças de difícil diagnóstico. Por conseguinte, novas estratégias terapêuticas poderão ser desenvolvidas e aplicadas de modo mais eficiente, quer para o tratamento quer para a prevenção da DA.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, H. S.; HOFFMAN, M. **Alzheimer Disease**. Medscape. [Acedido a 6 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/1134817-overview>.

BRASNJEVIC, I.; STEINBUSCH, H. W.; SCHMITZ, C., MARTINEZ-MARTINEZ, P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. **Prog Neurobiol.**, 87, 4, 212-51, 2008.

BROADWELL, R.; BALIN, B.; SALCMAN, M. Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 85, 2, 632-6, 1988.

COOPER, G.; HANSMAN, R. **The Cell: A Molecular Approach**. Editora ASM Dress/Sinaver Associate, Inc, 4ª Edição, pp. 301-328, 2007.

DELAY, C.; MANDEMAKERS, W; HÉBERT, S. S. MicroRNAs in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis.**, 46, 2, 285-290, 2012.

ERDLLENBRUCH, B.; JENDROSSEK, V.; EIBL, H.; LAKOMEK, M. Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. **Exp Brain Res.**, 135, 3, 417-22, 2000.

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

GONATAS, N. K.; STIEBER, A., HICKEY, W. F.; HERBERT, S. H.; GONATAS, J. O. Endosomes and Golgi vesicles in adsorptive and fluid phase endocytosis. **J Cell Biol.**, 99, 4Pt1, 1379-90, 1984.

LAM, F. C.; LIU, R.; LU, P.; SHAPIRO, A. B.; RENOIR, J. M.; SHAROM, F. J.; REINER, P. Beta-Amyloid efflux mediated by P-glycoprotein. **J Neurochem.**, 76, 4, 1121-8, 2001.

LODISH, B.; MATSUDAIRA, W.; KRIEGER, S.; ZIPUNSKY, D. **Biologia Celular e Molecular**. Editora Artmed, 5ª Edição, cap. 12, 2006.

MILLER, G. Drug targeting. Breaking down barriers. **Science**, 16, 297, 5584, 1116-8, 2002.

National Institute on Aging. Alzheimer's disease: Unraveling the Mystery. U.S.A: NIH, p. 21-26, 2008.

PATEL, M. M.; GOYAL, B. R.; BHADADA, S. V.; BHATT, J. S.; AMIN, A. F. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. **CNS Drugs**, 23, 1, 35-58, 2009.

ROCHA, S. Targeted drug delivery across the blood brain barrier in Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des.**, 19, 37, 6635-46, 2013.

SAHNI, J. K.; DOGGUI, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; DAO, L.; RAMASSAMY, C. Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. **J Control Release**, 10, 152, 2, 208-31, 2011.

SAIJA, A.; PRINCI, P.; TROMBETTA, D.; LANZA, M.; DE PASQUALE, A. Changes in the permeability of the blood-brain barrier following sodium dodecyl sulphate administration in the rat. **Exp Brain Res.**, 115, 3, 546-51, 1997.

Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S, K. Drug delivery systems: An updated review. **Int J Pharm Investig.**, 2, 1, 2-11, 2012.

VANDERGRIFT, W.; PATEL, S.; NICHOLAS, J.; VARMA, A. K. Convection-enhanced delivery of immunotoxins and radioisotopes for treatment of malignant gliomas. **Neurosurg Focus.**, 15, 20, 4, E13, 2006.

Vogelgesang, S.; Cascorbi, I.; Schroeder, E.; Pahnke, J.; Kroemer, H. K.; Siegmund, W.; Kunert-Keil, C.; Walker, L. C.; Warzok, R. W. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. **Pharmacogenetics**, 12, 7, 535-41, 2002.

ZHANG, H.; SHYKIND, B.; SUN, T. Approach to manipulating microRNAs in neurogenesis. **Front Neurosci.**, 17, 6, 196, 2013.