FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

HENRIQUE MIRANDA CABRAL

DISRUPÇÃO DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS CEREBRAIS

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROCIRURGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR MARCOS DANIEL BARBOSA

MARÇO/2013

Disrupção da barreira hemato-encefálica no tratamento de neoplasias cerebrais

Henrique Miranda Cabral

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço electrónico: cabralhm@gmail.com

2013

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Marcos Barbosa pelo apoio desinteressado, empenho, tempo, conhecimento e paciência dispensados na execução deste trabalho,

À Dra. Helena Donato pelo auxílio e paciência na conceptualização e realização da pesquisa bibliográfica,

À minha mãe, pai e irmã,

À minha inolvidável avó,

Aos meus amigos por serem uma família longe de casa.

A todos os que, directa ou indirectamente, participaram na realização deste trabalho.

"All truths are easy to understand once they are discovered;
the point is to discover them"

Galileo Galilei

Listas:

Lista de Abreviaturas

AAV2 – A*deno-associated vírus*;

ABC – *ATP-binding cassette*;

ADN – Ácido desoxiribonucleico;

Alb-R – Receptor da albumina;

ATP – Adenosina tri-fosfato;

BBBD – *Blood brain barrier disruption*;

BCNU– Bis-cloroetilnitrosureia**,** carmustina;

BHE – Barreira hemato-encefálica;

BHT – Barreira hemato-tumoral;

Carmustina – BCNU, biscloroetilnitrosureia;

GBM – Glioblastoma multiforme;

c-erbB2 – Ver HER2;

CP-R – Receptor da ceruloplasmina;

CSC – *Cancer stem-cell*;

EC – *Endothelial cell*;

EGFR – *Epidermal growth factor receptor* – receptor para o factor de células epidérmicas;

EPC – *Endotelial progenitor cell*;

FUS – *Focused ultrasound*;

GLUT – Transportador da glucose;

gp-P – Glicoproteína P;

HER2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor* 2;

HSV – Herpes simplex vírus;

IA – Infusão arterial;

Ins-R – Receptor da insulina;

IL –Interleucina;

IV – Intravenoso;

K_{Ca} – Canais de potássio activados pelo cálcio;

K_{ATP} – Canais de transporte activo de potássio;

LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*;

LCR – Líquido céfalo-raquidiano;

LPSNC – Linfoma primário do sistema nervoso central;

JAM – *Junction adhesion molecules*;

MALDI-TOF – *Matrix-assisted LASER desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometer*;

MDR – *Multi-drug resistance*;

MION-47 – Contraste ressonância magnética funcional;

MRP – *Multidrug resistance protein*;

PE –Exotoxina de pseudomonas;

PEG – Polietilenoglicol;

RMN – Ressonância Magnética Nuclear;

shARN –Ácido ribonucleico *short hairpin*;

SNC – Sistema Nervoso Central;

Tf-R – Receptor da transferrina;

TGFα – *Transforming growth factor* alfa;

TJ – *Tight-junction*;

tPA – *Tissue plasminogen activator*;

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*;

ZO-1 – Proteína 1 da *zonula occludens*;

Lista de Tabelas

Tabela I – Diferenças entre o endotélio vascular periférico e cerebral 12

Tabela II – Estudos pré-clínicos em modelos animais de DBHE ultra-sónica associada a disponibilização de fármacos através da BHE 35

Tabela III – Diversos estudos de disponibilização de agentes terapêuticos com associação de disponibilização mediada por convecção/CED 46

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Número de proteínas da TJ (ocludina e claudina 5) em função do tempo antes e após aplicação do campo acústico através de um crânio intacto 32

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da associação entre os capilares cerebrais, os pés terminais dos astrócitos e os pericitos 14

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de transporte através da BHE 16

Figura 3 – Diferenças entre os capilares da BHT e BHE 19

Figura 4 – Imagem ilustrativa de disrupção IA selectiva através da utilização de manitol e bevacizumab 27

Figura 5 – Demonstração esquemática da DBHE através da utilização de microbolhas sujeitas a um campo acústico 31

Figura 6 – Demonstração esquemática da hipótese relacionada com a utilização de DBHE ultra-sónica associada à utilização de micro-bolhas 38

Índice

Listas: 1

Lista de Abreviaturas 1

Lista de Tabelas 3

Lista de Gráficos 3

Lista de Figuras 4

Resumo 6

Abstract 8

Introdução 9

Material e Métodos 10

Contextualização Teórica 11

A barreira hemato-encefálica (BHE) 11

Constituição da BHE 11

Transportadores de efluxo 17

Barreira hemato-tumoral (BHT) 18

Tratamento sistémico de neoplasias do SNC 19

Limitações impostas pela BHE na disponibilização neurofarmacológica 20

Resultados 22

Técnicas de disrupção da BHE: 23

Disrupção osmótica 24

Disrupção bioquímica 29

Disrupção ultra-sónica 30

Disponibilização directa 40

Nanotecnologia 47

DBHE associada a anticorpos 48

Terapia genética associada à DBHE 50

Discussão 52

Conclusão 55

Futuro 56

Bibliografia 57

Resumo

As neoplasias cerebrais condicionam uma elevada taxa de mortalidade e mau prognóstico. A terapia médica das neoplasias cerebrais constitui um enorme desafio à Medicina moderna uma vez que a maioria dos agentes terapêuticos não atinge o parênquima cerebral porque não consegue atravessar a barreira hemato-encefálica. Esta barreira apresenta-se como uma entidade paradoxal, sendo fisiologicamente protectora e, simultaneamente, um obstáculo terapêutico. Consequentemente, a disrupção transitória, reversível e localizada desta barreira, associada à administração de diversos agentes farmacológicos, constitui a base conceptual para diversas estratégias terapêuticas.

Através da análise dos resultados de diversos estudos e artigos de revisão acerca das várias técnicas disruptivas, pretende o autor sumariar as principais características de diversas técnicas disruptivas; verificar se existe disrupção da BHE e se existe aumento da concentração parenquimatosa aquando da associação de agentes terapêuticos; contribuir para um aumento do conhecimento relativamente à existência da necessidade e do papel que estas técnicas assumem no tratamento de tumores cerebrais.

A análise de diversos estudos relativos a diferentes técnicas disruptivas demonstra a pertinência da disrupção da barreira hemato-encefálica enquanto entidade terapêutica, demonstrando um controlo na progressão tumoral e aumento da sobrevida sem progressão da doença. No entanto, é também premente a necessidade de mais estudos clínicos que avaliem a eficácia e, acima de tudo, a segurança dos diversos métodos disruptivos. Além disso, a investigação futura no que concerne à terapêutica de neoplasias cerebrais deverá abordar de forma holística não só a problemática imposta pela BHE, mas também a capacidade de captação de fármaco pelo tumor, o metabolismo intra-celular do fármaco, o *washout* do agente para o meio extra-celular ou para o LCR, a própria sensibilidade à quimioterapia e a existência de mecanismos de resistência. A compreensão da proteómica e genómica da BHE

também assume um papel fundamental na investigação futura permitindo um consequente melhor entendimento acerca da cinética neuro-farmacológica.

Palavras-chave: disrupção da barreira hemato-encefálica; DBHE; neoplasias cerebrais; DBHE ultra-sónica; DBHE associada a micro-bolhas.

Abstract

Brain cancer is accompanied by high mortality rate and dismal prognosis. Its medical treatment presents as a major challenge to modern medicine as most therapeutic agents cannot reach the brain tissue due to their inability to cross the blood-brain barrier. The BBB presents as a paradoxal structure, physiologically protective and, simultaneously, a therapeutic hindrance. Thus, the transient, reversible and focused disruption of this barrier, combined with the administration of therapeutic agents, builds the conceptual basis for various treatment strategies.

Through the analysis of the results of published studies and review articles concerning the different disruptive techniques, the author intends to summarize the main characteristics of some of these techniques and partake in the increase of the knowledge about the role that these play as therapeutic strategies for brain cancer.

The analysis of several studies shows the importance of these BBB disruptive techniques as potential therapeutic maneuvers, showing control in tumor progression and increasing the progression-free survival. Nevertheless, more clinical studies are needed for evaluation of the efficacy and, above all, the security of these disruptive techniques.

Keywords: blood-brain barrier disruption; BBBD; brain cancer; FUS BBBD; BBBD microbubbles.

Introdução

Os tumores cerebrais apresentam uma incidência relativamente baixa quando comparados a outras neoplasias, no entanto são acompanhados de um prognóstico pouco favorável, sendo alguns associados a elevada mortalidade [3]. O carácter infiltrativo e invasivo de alguns tumores cerebrais, associado à localização numa cavidade intracraniana autolimitada e consequências advenientes, fundamentam a necessidade premente de eficácia terapêutica.

A quimioterapia sistémica, opção para grande parte dos processos neoplásicos, apresenta resultados insatisfatórios no que concerne ao tratamento dos tumores cerebrais, muitas vezes não se atingindo concentrações terapêuticas no parênquima cerebral. Apesar de constituir um dos principais mecanismos protectores do SNC, a BHE constitui um obstáculo significativo à quimioterapia, ao impedir a passagem de moléculas terapêuticas. Consequentemente, a presença dessa barreira constitui um obstáculo significativo ao aporte da maioria dos agentes terapêuticos, limitando consideravelmente o tratamento médico dos tumores cerebrais.

A utilização de disrupção temporária da barreira hemato-encefálica, associada a administração de agentes quimioterapêuticos, revelou resultados promissores na diminuição dos efeitos secundários sistémicos e demonstrou impacto significativo no controlo da doença e na sobrevida, sendo o objectivo principal deste trabalho a constatação da pertinência da utilização destes métodos disruptivos, associados à administração de fármacos, no tratamento de tumores cerebrais.

Material e Métodos

A pesquisa de artigos foi realizada através da Medline com interface PubMed utilizando a seguinte equação de pesquisa:

("Blood-Brain Barrier"[Mesh]) AND "Brain Neoplasms/surgery"[Mesh]

A pesquisa foi realizada com os *limits language*, inglês e português.

Foi ainda efectuada uma pesquisa em texto livre, aplicando-se os mesmos *limits*, com a seguinte equação de pesquisa:

(Blood-Brain Barrier OR blood brain disruption) AND (Brain Neoplasms OR brain tumor OR brain cancer) AND (surgery OR surgical OR neurosurg*)

Foi consultada também a Cochrane Sistematic Reviews, não tendo sido encontrado nenhum estudo acerca do tema em questão.

O Índex das Revistas Médicas portuguesas foi também consultado de forma a verificar a existência algum estudo nacional acerca do tema deste trabalho, não se tendo encontrado nenhum.

A referida pesquisa resultou num total de 161 resultados, sendo excluídos os artigos que não se enquadravam no contexto deste trabalho ou que estavam desactualizados de acordo com artigos mais recentes.

Contextualização Teórica

A barreira hemato-encefálica (BHE)

A BHE é um paradoxo. Por um lado, protege o Sistema Nervoso Central (SNC) do que seria uma constante agressão tóxica causada pelas diversas substâncias em circulação, caso não existisse; por outro, impede a passagem de grande parte dos agentes terapêuticos para tratamento de patologia do SNC.

A BHE constitui a interface entre o fluido extracelular cerebral do Sistema Nervoso Central e o conteúdo endovascular circulante, estando fisicamente limitada ao espaço entre os pés terminais dos astrócitos e a superfície das células endoteliais. Esta barreira é constituída, entre outros elementos, por células endoteliais altamente especializadas que contribuem, juntamente com a barreira hemato-LCR, para a manutenção da homeostase do SNC, evitando a entrada de substâncias com potencial de alterar o correcto funcionamento neuronal.

Constituição da BHE

A BHE constitui uma barreira física e fisiológica, que regula a passagem de solutos do sangue circulante para o SNC, e vice-versa. As características desta barreira devem-se especialmente às particularidades morfológicas e funcionais do endotélio vascular cerebral, diferente do endotélio dos leitos capilares periféricos; a uma série de *tight junctions* entre as diversas células endoteliais, que diminuem a difusão paracelular; a uma ausência de fenestrações capilares e baixa actividade pinocítica endotelial, regulando a passagem transcelular de moléculas; a vários sistemas de transporte próprios que asseguram o correcto

suprimento nutricional do SNC bem como a adequada drenagem dos produtos do metabolismo e de outros produtos potencialmente tóxicos [4].

De forma a compreender melhor a singularidade do endotélio dos capilares cerebrais, encontram-se resumidas na tabela I as principais diferenças entre este endotélio e o de capilares periféricos.

	Células endoteliais de capilares periféricos	**Células endoteliais de capilares cerebrais**
Poros entre células endoteliais	Presentes, formados pela fenda intercelular entre duas células endoteliais adjacentes	Inexistentes
Junções intercelulares	Laxas, complexos proteicos juncionais ocasionais	*Tight juncions* contínuas
Vesículas Pinocíticas	Presentes	Baixo número
Fenestrações	Presentes	Ausentes
Percentagem de mitocôndrias	Baixa	Elevada
Resistência eléctrica	Baixa (10ohm/cm2)	Elevada (1000-2000ohm/cm2)

Tabela I – Diferenças entre o endotélio vascular periférico e cerebral, adaptado de Deeken, J.F. and W. Loscher, The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. Clin Cancer Res, 2007. 13(6): p. 1663-74. [5]

O principal elemento responsável pela restrição selectiva de fluxo entre a circulação sistémica e a cerebral são as *tight-junctions* (TJ), junções entre as diversas células endoteliais, constituídas por proteínas como a ocludina e a claudina, moléculas de adesão juncional (junction adhesion molecules- JAMs) e proteínas citoplasmáticas ligadas ao citoesqueleto de actina. Estas TJ impedem a troca livre de solutos entre células endoteliais, contribuindo assim

para um melhor controlo da homeostase através de intervenção no processo de adesão celular, constituindo também barreiras à difusão intramembranar e paracelular [6].

A superfície abluminal das células endoteliais é constituída por uma lâmina basal composta por colagénio tipo IV, fibronectina, sulfato de heparano e laminina, que funcionam como barreiras de peso molecular e eléctrica, interagindo de forma complexa com integrinas e interferindo com diversos mecanismos de permeabilidade e transporte [7]. A passagem de moléculas para o espaço intercelular é restringida a apenas pequenas moléculas hidrofílicas [8] (figura 2, mecanismo III), devendo, no entanto, ser ressalvado que o facto de as moléculas serem pequenas não assegura a sua passagem através da BHE [9]. Consequentemente, a maioria da passagem de moléculas do sangue para o SNC ocorre por transporte transcelular que também se encontra limitado devido à diminuta quantidade de fenestrações e actividade pinocítica existentes no endotélio cerebral [8], potenciando a impermeabilidade da membrana.

Além das células endoteliais e dos seus constituintes, outras duas populações celulares encontram-se directamente envolvidas no estabelecimento desta barreira: os pericitos e os astrócitos (figura 1). Os primeiros são células similares aos macrófagos com características de músculo liso, inseridas na membrana basal que envolve os vasos sanguíneos [10], constituindo um importante elemento na regulação da permeabilidade da BHE, através da libertação de substâncias vasoactivas. São também recrutados durante a fase de desenvolvimento dos capilares cerebrais, contribuindo para o desenvolvimento das TJ [11] através da aproximação celular [12]. Os segundos envolvem directa e quase completamente os capilares cerebrais (cerca de 90% dos capilares cerebrais são envoltos pelos pés terminais dos astrócitos [12]), formando quase uma segunda barreira que, apesar de não tão impermeável quanto a primeira (formada pelas células endoteliais dos capilares cerebrais) [8], interfere na regulação da sua permeabilidade, uma vez que as células da astroglia libertam factores que modulam a permeabilidade do endotélio cerebral [5]. Além disso, experiências *in*

vitro com linhagens celulares imortalizadas demonstraram que os astrócitos são essenciais para a expressão da gama-glutamiltranspeptidase, do transportador de glicose GLUT1, TJ intercelulares e da gp-P [13] (figura 1).

Além das duas barreiras físicas acima referidas, os capilares endoteliais possuem uma

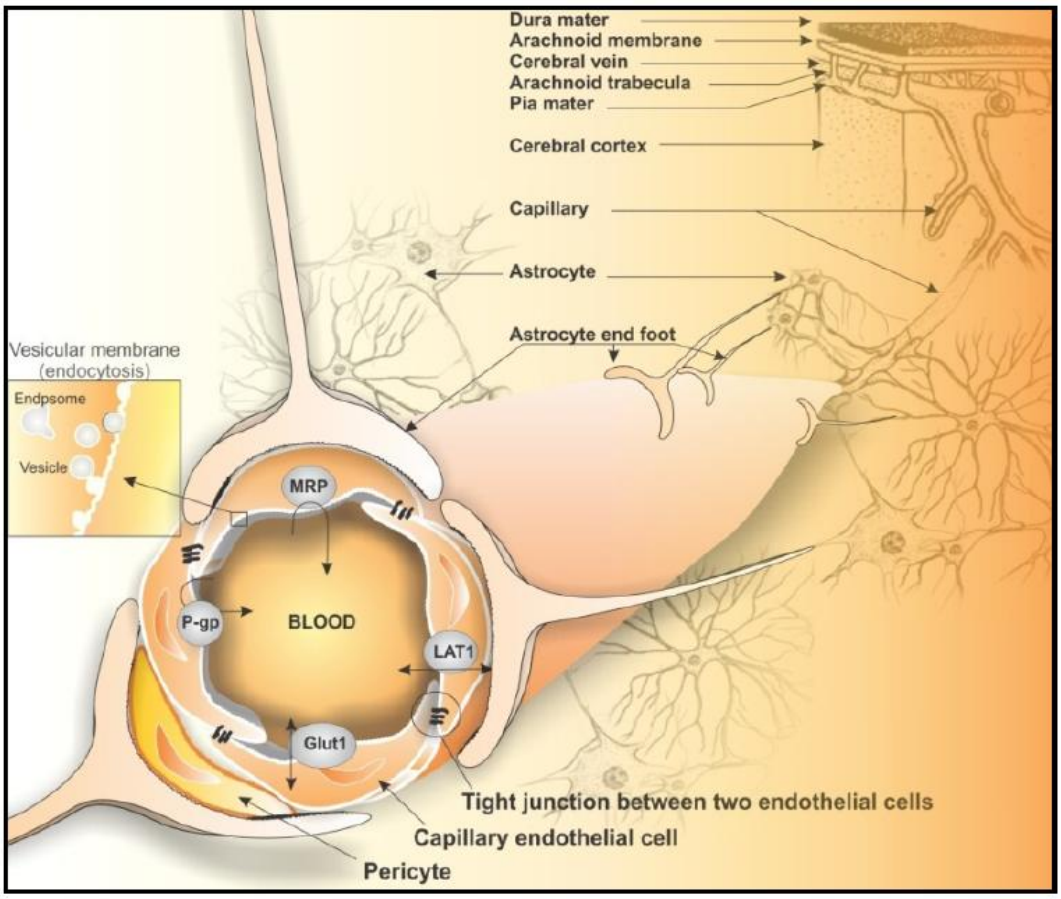

Figura 1 – Representação esquemática da associação entre os capilares cerebrais, os pés terminais dos astrócitos e os pericitos. Esta ilustração evidencia também o contacto entre os pés terminais dos astrócitos com, por um lado, os capilares cerebrais, e por outro com os pericitos. Também ilustrados alguns mecanismos de transporte luminal. Adaptado de Omidi, Y. and J. Barar, Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. BioImpacts, 2011. 2(1): p. 5-22 [1]

elevada resistência eléctrica, constituindo uma barreira eléctrica, essencialmente para moléculas polares e substâncias iónicas. Assemelha-se assim a uma membrana epitelial pela sua elevada resistência eléctrica [14] (entre 1000 e 2000 ohm/cm2 [5]), conferida devido à

elevada expressão de ocludina e de transportadores aniónicos e catiónicos através da membrana luminal e basolateral, gerando um gradiente eléctrico [5].

Uma das características mais importantes e únicas do endotélio capilar cerebral assenta na intercomunicação entre os diversos constituintes da BHE, através de um sistema dinâmico e complexo de sinalização paracrínica [15, 16]. A maioria do *uptake* molecular para o SNC ocorre por mecanismos de transporte paracelular, possível devido à existência de uma diversa rede de transportadores moleculares, assegurando assim o correcto suprimento nutricional, bem como a eficaz remoção de produtos do metabolismo celular e tóxicos [9]. Uma molécula apenas atravessa a BHE através de difusão passiva (moléculas lipofílicas de pequenas dimensões – figura 2, mecanismo 1) ou transporte activo, existindo três mecanismos de transporte activo de moléculas da circulação sistémica para o SNC: endocitose mediada por transportador (figura 2, mecanismo 2), mediada por receptor (figura 2, mecanismo 4) e endocitose absortiva (figura 2, mecanismo 5). A endocitose mediada por transportador é responsável pelo influxo de pequenas moléculas, como iões e aminoácidos [17]. A endocitose mediada por receptores, por moléculas de maiores dimensões, como a insulina e a transferrina. Através deste sistema, a molécula circulante adere a um receptor, específico, existente na parede luminal endotelial. Caso se verifique especificidade, ocorre a endocitose por transporte vesicular da molécula para a membrana basolateral, atingindo o SNC [17]. A endocitose adsortiva refere-se à interacção entre partículas eléctricas, essencialmente relacionada com o transporte de albumina e outras proteínas plasmáticas. Aparentemente, este último mecanismo de transporte é largamente dependente da interacção entre partículas cationizadas e a BHE [12].

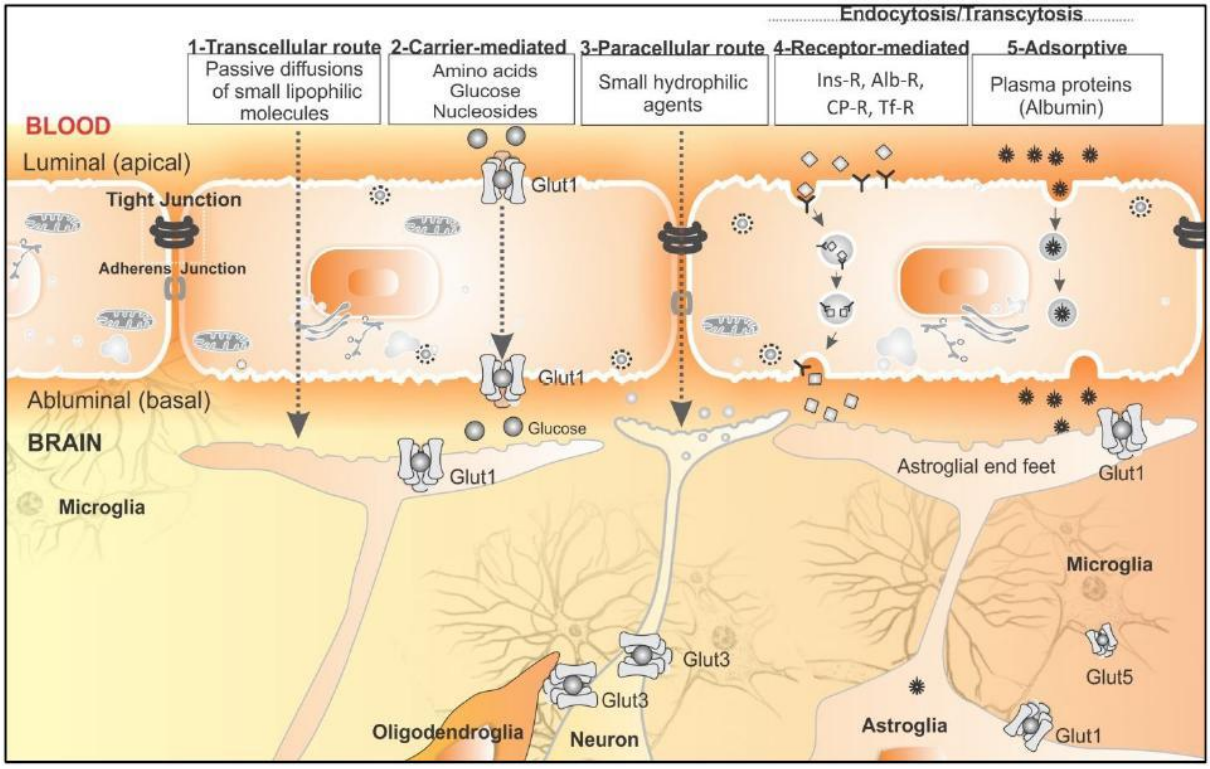

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de transporte através da BHE. Adaptado de Omidi, Y. and J. Barar, Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. BioImpacts, 2011. 2(1): p. 5-22 [1]

No entanto, todas as moléculas que não possuam transportadores paracelulares apenas conseguem atravessar a barreira através de difusão passiva, sendo que a sua passagem depende de diversos factores, nomeadamente: da solubilidade lipídica (coeficiente de partição octanol:água), do peso molecular (<400-500Da) [5, 18], do grau de ionização, da capacidade de ligação a proteínas plasmáticas, da concentração plasmática, da especificidade para determinados transportadores e, finalmente, do fluxo sanguíneo local [8, 19]. Mahar Doan *et al.*, após análise das propriedades físico-químicas de diversos solutos utilizados no tratamento de doenças do SNC, verificaram que as substâncias que melhor penetram no parênquima cerebral têm grande lipofilia, baixo grau de polaridade, são pouco dadoras de grupos H+, têm menos cargas positivas e baixa flexibilidade [19]. Assim se conclui que moléculas com bom potencial de passagem através da BHE através de difusão passiva são preferencialmente

pequenas (<400-500Da), lipofílicas e apolares. Compostos hidrofílicos ou polares apenas conseguem atravessar a BHE através de sistemas de transporte activo.

Transportadores de efluxo

Apesar de ser expectável que substâncias lipofílicas difundam facilmente através da BHE, verifica-se que existe uma permeabilidade inferior ao esperado, essencialmente devido ao facto de muitas destas moléculas lipofílicas servirem de substrato a transportadores de efluxo, que mobilizam substâncias potencialmente agressoras do parênquima cerebral para o lúmen capilar.

Estes transportadores são expressos nas células endoteliais e um dos exemplos melhor estudado e dos transportadores mais comuns nas células cerebrais é a gp-P, existindo, no entanto, muitos outros como os da família MRP – Multidrug Resistance Protein- ou famílias de transportadores catiónicos ou aniónicos orgânicos [5], RLIP76/RALBP1 (um transportador multi-específico não ligado à ABC recentemente descoberto [20]), que podem ser expressos na superfície abluminal ou luminal das células endoteliais dos capilares cerebrais.

Os transportadores da família da gp-P, principal transportador de efluxo, pertencem colectivamente à superfamília dos transportadores adenosina trifosfato-*binding cassette* (ABC), resultado da expressão do gene MDR1, MDR2 e MDR3 (*multi-drug resistance*) em humanos, existindo também em outros mamíferos. Este tipo de transportador foi inicialmente descoberto com expressão elevada em tumores associados a resistência terapêutica, tendo sido posteriormente estabelecida a relação causal entre a expressão do gene MDR1 e o fenótipo tumoral resistente a diversos fármacos [21]. São expressos principalmente em tecidos com função barreira, como os epitélios hepático, renal, intestinal e células endoteliais capilares cerebrais, ovarianas e testiculares [6], sugerindo assim que esta proteína está envolvida em

mecanismos de protecção de diversos órgãos. Estas proteínas membranares encontram-se amplamente expressas no tecido cerebral normal e eliminam do SNC diversos tóxicos, sendo que, curiosamente, em situações em que existe maior agressão tóxica cerebral (quimioterapia, por exemplo), estas se encontram expressas em maior número [22], o mesmo acontecendo em estados neoplásicos. O aumento da expressão destes transportadores nas situações referidas constitui um dos maiores obstáculos à terapêutica de patologia do SNC, uma vez que a maioria dos agentes terapêuticos é substrato para esses referidos transportadores, que os removem eficazmente do SNC, limitando assim o *uptake* cerebral e consequentemente o respectivo efeito terapêutico, sendo que a BHE impede a passagem de cerca de 95% de moléculas potencialmente terapêuticas [23]. Como tal, nos últimos anos têm-se desenvolvido diversas estratégias para contornar os efeitos deletérios deste mecanismo protector.

Barreira hemato-tumoral (BHT)

A neo-vasculatura tumoral, através dos seus componentes intrínsecos e à semelhança da BHE, acaba por constituir por si mesma uma barreira semi-permeável com propriedades fisiológicas idiossincráticas, denominada barreira hemato-tumoral, possuindo características estruturais e funcionais diferentes da BHE [2]. Existe uma alteração na permeabilidade da BHT, devido a re-organizações da unidade neurovascular pelo micro-ambiente tumoral. Ningaraj *et al.* demonstraram, por meios de microscopia electrónica de transmissão, que agonistas dos canais de potássio induzem uma aceleração na formação de vesículas de transporte transmembranar [24]. No entanto, principalmente na margem tumoral, estes vasos mantêm algumas das características da BHE íntegra, nomeadamente a presença dos transportadores de efluxo, bem como alguma integridade estrutural. Consequentemente, apesar das alterações da BHE/BHT, a maioria dos agentes anti-neoplásicos continua a ser ineficaz devido à incapacidade de atravessarem a BHE/BHT em doses suficientes para terem efeito terapêutico. Algumas características da BHT são exploradas na figura 3. A natureza

infiltrativa das células tumorais, que invadem as células cerebrais normais na região peri-tumoral causa uma dificuldade acrescida na disponibilização de agentes terapêuticos [2].

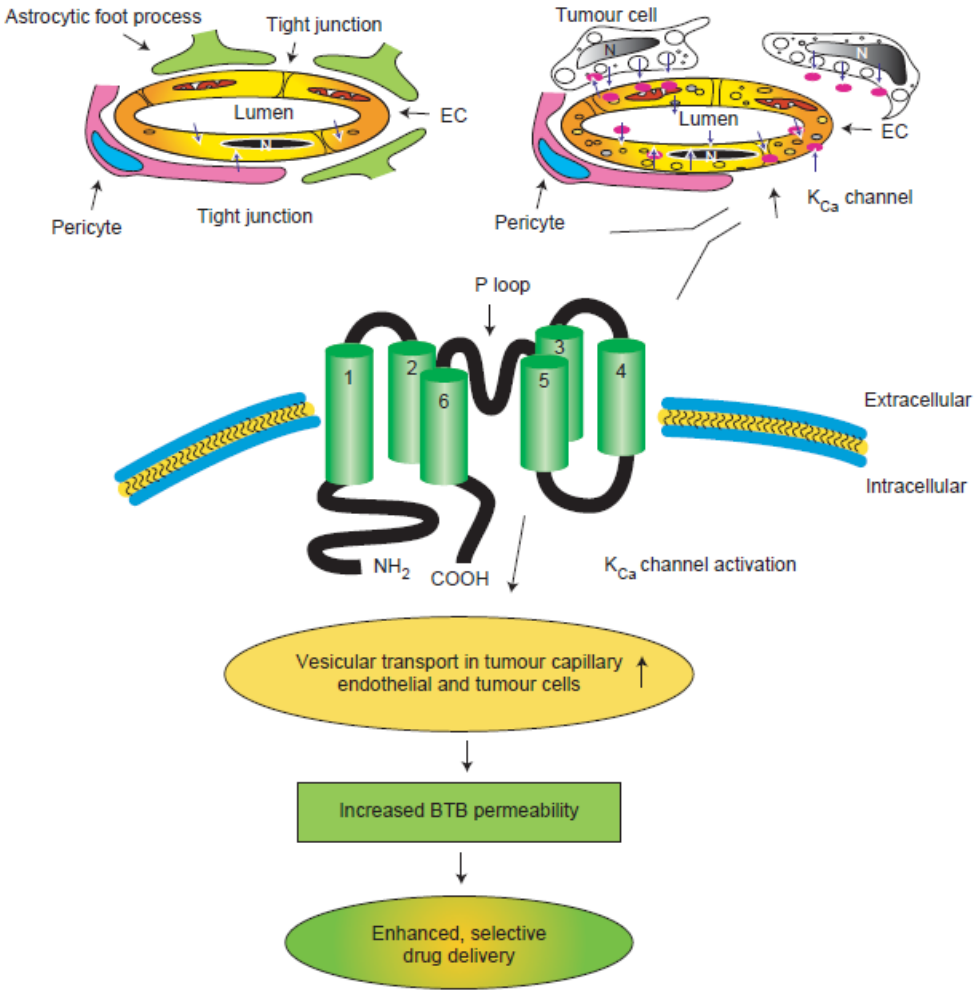

Figura 3 – Diferenças entre os capilares da BHT e BHE. Os capilares da BHT apresentam diferenças relativamente aos da BHE: existe uma sobre-expressão de canais iónicos nas células endoteliais dos capilares da BHT, desempenhando um papel importante na modulação da função destas células e, consequentemente, influenciando alterações na BHE, adaptado de Ningaraj, N.S., Drug delivery to brain tumours: challenges and progress. Expert Opin Drug Deliv, 2006. 3(4): p. 499-509. [2]

Tratamento sistémico de neoplasias do SNC

Actualmente, a maioria dos agentes antineoplásicos para terapia de tumores cerebrais são administrados de forma sistémica, quer através de formulações orais, quer através de administração IV, consoante o perfil de biodisponibilidade do fármaco [12]. Apesar de alguns

fármacos terem características que lhes permitem acesso a alguns tumores, as limitações expostas anteriormente constituem um obstáculo ao sucesso da maioria dos regimes de quimioterapia. O aumento da dose em regimes de terapia IV foi investigado, tendo sido acompanhado de aumento da toxicidade sistémica [12]. No entanto os resultados do estudo apresentado previamente não podem ser aplicados transversalmente a todos os fármacos, uma vez que a intensificação da dose de metotrexato apresentou bons resultados no tratamento de linfomas do SNC [25]. O aumento da dose de outros fármacos, como a carboplatina ou o etoposido, também foi investigado, mas os resultados não foram tão animadores, com maiores níveis de toxicidade [26].

Limitações impostas pela BHE na disponibilização neurofarmacológica

A disponibilização intra-cerebral de fármacos, bem como a disrupção da BHE, têm assumido um papel importante no contexto da investigação realizada na área da neuro-oncologia. A disponibilização melhorada de fármacos ao parênquima e consequente evicção dos efeitos deletérios da BHE pode ser atingida através da melhoria das características físico-químicas dos fármacos ou através da associação destes a agentes transportadores (como transportadores endógenos). O avanço da tecnologia biomédica associado a esta necessidade de contornar a BHE resultou no desenvolvimento de substâncias inovadoras, como nanopartículas, micropartículas transportadoras de anti-cancerígenos, PEGilação, encapsulação lisossomal de quimioterapêuticos em lisossomas ou até mesmo anticorpos monoclonais enquanto veículos transportadores de agentes anti-cancerígenos [2]. Por outro lado, as TJ entre as células endoteliais da BHE podem ser temporariamente interrompidas

através de diversos métodos, que cursam com uma disrupção temporária e reversível da BHE, sendo esta disrupção das TJ uma das principais técnicas analisadas neste trabalho.

As células endoteliais constituem uma das principais áreas de interesse investigacional no que se refere ao desenvolvimento de novas estratégias de terapêutica neuro-oncológica. Sendo um dos principais componentes da BHE e da unidade neurovascular, envergam grande parte dos mecanismos que se constituem como obstáculos à terapêutica. Apesar da sua importância, estas células apresentam-se ainda como um mistério não completamente esclarecido, uma vez que o conhecimento relativamente ao seu funcionamento, genética e expressão proteica em condições normais ou tumorais ainda não são completamente compreendidos [27]. Este desconhecimento deve-se essencialmente à dificuldade em isolar células endoteliais, bem como devido às diferenças existentes entre as células endoteliais normais e as células endoteliais tumorais. Por exemplo, são encontradas diferenças significativas entre as células endoteliais dos capilares cerebrais normais e as dos capilares cerebrais tumorais, nomeadamente expressão diferente dos canais de potássio activados pelo cálcio (K_{Ca}) e do canal de transporte activo de potássio (K_{ATP}) [24, 28].

Ningaraj *et al.*, através da utilização de tecnologia de miscroscopia a LASER, procederam ao isolamento de células endoteliais cerebrais normais e tumorais, sendo posteriormente a amostra sujeita à técnica de MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometer*) e recorrendo ao estudo proteómico e genómico de forma a identificar diferenças na expressão proteica entre os dois tipos de células. Este tipo de estudos servirá de base para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos e adaptação farmacogenómica dos agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento actual das neoplasias cerebrais, incluindo terapia genética através de vectores ou transplante autólogo de células modificadas [2].

Resultados

Devido às suas características electrofisiológicas, a BHE íntegra impede a passagem de moléculas ionizadas, hidrofílicas ou com peso molecular superior a 180 Da, e, uma vez que a maioria dos agentes quimioterapêuticos apresenta pesos moleculares compreendidos entre os 200 Da e os 1200 Da, esta barreira constitui o principal obstáculo à terapia de neoplasias cerebrais, uma vez que não permite a respectiva passagem destes fármacos [29].

A transposição desta barreira constitui assim a base conceptual para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Apesar dos avanços neurofarmacológicos relativos à alteração química de diversas substâncias de forma a atravessarem melhor a BHE, a maioria dos esforços no que concerne a esta área de investigação concentra-se no desenvolvimento de estratégias de disrupção ou transposição desta barreira.

Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas estratégias de disrupção da BHE, uma vez que o tratamento das neoplasias cerebrais através da via sistémica possui diversas limitações e efeitos indesejados. A intensificação da dose foi uma estratégia estudada, no entanto a toxicidade sistémica ultrapassa os modestos benefícios resultantes [26].

Técnicas de disrupção da BHE:

A difusão passiva através de qualquer membrana é proporcional ao gradiente de concentrações entre os dois espaços separados pela membrana, bem como ao coeficiente de difusão da própria membrana. Como tal, de forma a assegurar uma maior passagem de fármacos através da membrana, a BHE poderá ser sujeita a disrupção temporária, permitindo assim aumentar a difusão, assegurando uma maior biodisponibilidade do fármaco.

A DBHE cursa com alterações globais na microvasculatura cerebral, culminando na alteração da permeabilidade para diversas moléculas. Existem diversos mecanismos para aumentar a concentração intraparenquimatosa de fármacos, nomeadamente através de diversas técnicas de DBHE como disrupção osmótica, bioquímica, ultra-sónica, administração directa no parênquima cerebral, sistemas de biodisponibilização intra-cavitários, disponibilização mediada por convecção – CED, bem como associada a vectores virais de materiais genéticos ou constructos genéticos, associada a nanonecnologia e ainda a anticorpos. Seguidamente procede o autor a uma breve exposição de algumas das referidas técnicas.

Disrupção osmótica

Este método de disrupção transitória da BHE consiste na IA de agentes hiperosmóticos, frequentemente o manitol [30]. A injecção de uma solução hiperosmótica causa uma rápida difusão de fluido do meio intracelular para o extracelular, respeitando o gradiente de concentração, promovendo a plasmólise das células endoteliais, gerando um afastamento intercelular e consequente abertura das TJ endoteliais e criando uma via transcelular, entre as células endoteliais [2]. Esta infusão de agentes hiperosmóticos pode ser seguida de uma infusão IA de agentes quimioterapêuticos, actuando como um facilitador de difusão desses agentes.

O principal objectivo é co-adjuvar a administração de fármacos, com o intuito de aumentar a sua concentração parenquimatosa, peri-tumoral, tumoral ou subendotelial, através da manipulação da permeabilidade da BHE. Esta permeabilização é transitória, mas tem uma duração suficiente para permitir a infusão de uma molécula terapêutica. Permite uma diminuição da acção da bomba de efluxo gp-P, assegurando uma maior concentração da molécula terapêutica, uma vez que a maior parte dos agentes quimioterapêuticos constitui um substrato para a gp-P que, quando activa, diminui a concentração dessas moléculas.

Angelov *et al.* demonstraram que a disrupção osmótica da BHE resulta numa maior biodisponibilidade de agentes quimioterapêuticos (no caso do estudo, metotrexato), 50 a 100 vezes superior à atingida quando não utilizada a DBHE [31]. Outro estudo refere que a concentração de metotrexato, quando utilizada a DBHE associada a IA, atinge valores quatro a sete vezes superiores, quando comparada com a mesma técnica sem DBHE [30]. Assim se depreende que a utilização da DBHE associada à infusão IA de metotrexato apresenta resultados bastante encorajadores no tratamento de neoplasias do SNC.

Estudos animais demonstram que este método aumenta a concentração de alguns fármacos (etoposido e carboplatina) no parênquima cerebral em valores até 90 vezes superiores aos alcançados com a terapia sistémica [32].

Por outro lado, o atingimento de concentrações elevadas de agentes quimioterapêuticos ao nível do parênquima cerebral não tumoral, uma vez que a disrupção não é selectiva, levanta diversas preocupações relativamente à neurotoxicidade adveniente. Agentes como a doxorubicina, cisplatina ou taxanos, que são sistemicamente bem tolerados, apresentam perfis de neurotoxicidade inaceitáveis quando associados à DBHE, podendo desencorajar a sua respectiva utilização [30].

Pacientes sujeitos a efeito de massa condicionado por tumores não devem ser submetidos a esta técnica uma vez que a DBHE contribui para o aumento alterações no fluxo osmótico entre o compartimento intra e extravascular, podendo colocar o paciente em risco de herniação cerebral [12].

Infusão Intra-arterial (IA)

A via IA refere-se à infusão regional de agente quimioterapêutico, produzindo um aumento significativo na concentração plasmática desse agente, o que se traduz, a nível prático, num aumento de concentração intra-tumoral numa razão 3-5.5 vezes superior [33].

A administração IA de diversos fármacos surge como um mecanismo de evitar o efeito de primeira passagem ao qual são sujeitos os agentes administrados por via sistémica. Esta via, quando utilizada para agentes com rápida depuração do SNC, resulta numa curta permanência do fármaco no SNC e consequente insatisfatória acção terapêutica, logo, a via IA isoladamente, não apresenta resultados satisfatórios [34, 35].

Por outro lado, a DBHE precedente à infusão IA apresenta melhores resultados [36]. A administração IA de carmustina (BCNU) e de outros agentes lipossolúveis revelou níveis de toxicidade intoleráveis [37], no entanto, com outros agentes quimioterapêuticos, nomeadamente a carboplatina [38] ou o metotrexato [39], esta IA apresenta menores níveis de toxicidade que a infusão IV sistémica [40]. No entanto, agentes como os taxanos, doxorubicina e cisplatina apresentam elevados perfis de neurotoxicidade, sendo bem tolerados quando administrados de forma sistémica [41]. Num estudo recente, Burkhardt *et al.* demonstram que a disrupção da BHE com manitol e subsequente infusão IA superselectiva de bevacizumab seguida de administração de bevacizumab IV, em pacientes com GBM, resultou numa redução estatisticamente significativa (P=0.001) da área tumoral transeccional, bem como um aumento da sobrevida sem progressão da doença para 10 meses, apresentando resultados encorajadores comparativamente a outras terapias utilizadas actualmente [42-44]. Numa série de casos, apresentada pelo mesmo autor, refere-se que em estudos prévios, a IA superselectiva de agentes quimioterapêuticos aumenta a concentração de Tc-hexametilpropilenoamina comparativamente à via IV. Esta via de administração está associada uma maior concentração parenquimatosa de fármacos, desde que associada a disrupção da BHE. Burkhardt *et al.* concluem que a infusão IA precedida de disrupção osmótica da BHE culmina num aumento do gradiente de concentração e do coeficiente de difusão, maximizando a difusão de agente quimioterápico através da BHE [44].

A infusão IA associada a DBHE permite o atingimento de uma concentração máxima de agentes infundidos no espaço perivascular, conhecido como “nicho perivascular”. Neste espaço, tal como demonstrado por Calabrese *et al.* [45], existem interacções entre células neoplásicas e células endoteliais saudáveis. O bevacizumab (anti-VEGF) mostrou reduzir o número de células tumorais e principalmente o crescimento de xenoenxertos provenientes de células Daoy-positivas. Além disso, as células tumorais podem transformar-se em células

endoteliais sob a égide da via do VEGF, inibindo o bevacizumab essa transformação. Os autores defendem assim que a disrupção e infusão selectivas IA do nicho perivascular são necessárias para a entrada dos agentes farmacológicos no espaço perivascular numa concentração clinicamente significativa (figura 4) [44].

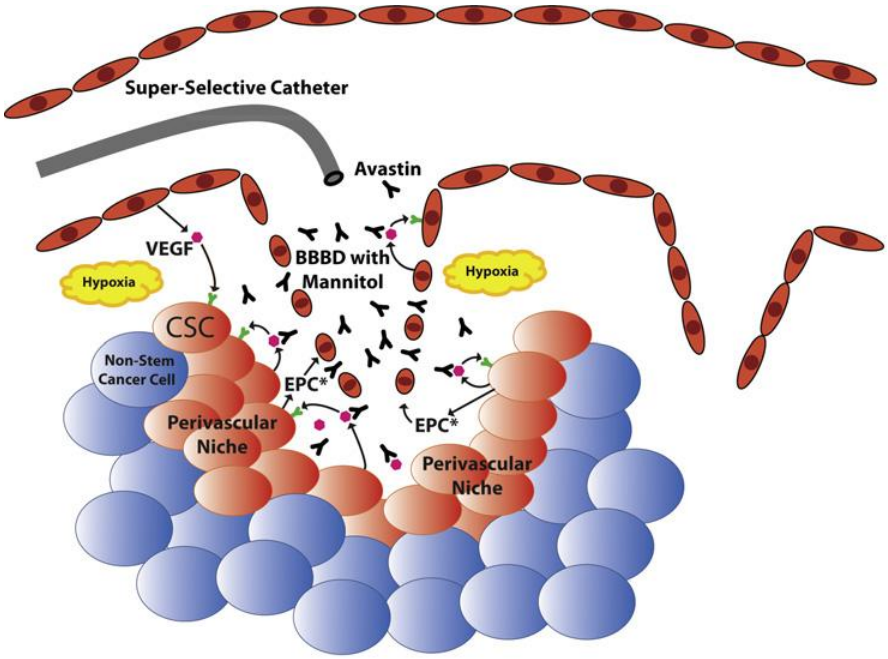

Figura 4 – Imagem ilustrativa de disrupção IA selectiva através da utilização de manitol e bevacizumab, adaptado de Burkhardt, J.K., et al., Intra-arterial delivery of bevacizumab after blood-brain barrier disruption for the treatment of recurrent glioblastoma: progression-free survival and overall survival. World Neurosurg, 2012. 77(1): p. 130-4.[44]

Um estudo multicêntrico, que incluiu 149 doentes com linfoma primário do SNC (LPSNC) [31] não tratados previamente com radioterapia holo-craniana, sujeitos a DBHE, e que receberam infusão IA de metotrexato, demonstrou que aos 8 anos 25% dos doentes ainda se encontravam vivos e, em alguns casos, essa sobrevida estendeu-se até aos 20 anos. Esta técnica revelou ainda resultados similares aos encontrados com a utilização de terapia combinada (quimioterapia sistémica e radioterapia holo-craniana), no entanto apresentando a vantagem de os indivíduos em estudo não apresentarem os comuns efeitos nocivos da radioterapia, nomeadamente as sequelas neurocognitivas [31]. Demonstrou-se assim que esta

opção terapêutica apresentou controlo duradouro da doença, perfis de toxicidade aceitáveis e potencial para adiamento da radioterapia e consequências da mesma. Este estudo, cujo follow-up se estende ao longo de 23 anos, sugere que este tipo de abordagem poderá constituir um tratamento de primeira linha, com impacto significativo na sobrevida e tempo sem progressão de doença, bem como no estado neurocognitivo [31].

Guillaume *et al.*, na exposição dos resultados de um estudo de fase I, revelam que foi observado um aumento de concentração de fármaco no tumor e tecido peri-tumoral, numa razão entre 10 e 100 vezes superior, quando comparado com a administração IV [29]. Refere também que a utilização de carboplatina e melfalano administrados IA, associada a DBHE, apresenta perfis de toxicidade aceitáveis e níveis de eficácia encorajadores [29].

Foi estabelecida uma correlação entre a dose administrada e a taxa de sobrevida, em doentes com LPSNC, tratados com DBHE/IA e nenhum dos indivíduos tratados apresentou declínio neurocognitivo [46].

Apesar de apresentar perfis de toxicidade aceitáveis e outras vantagens acima referidas, esta técnica possui alguma dificuldade intrínseca, sendo realizada em poucos centros especializados [31], apresentando também algumas complicações isquémicas, relacionadas com a cateterização do vaso infundido e até mesmo com o efeito irritativo exercido pelo próprio agente quimioterapêutico [36]. Além disso, a DBHE não selectiva causa uma permeabilização de toda a BHE em contacto com a artéria infundida, aumentando o potencial de neurotoxicidade, podendo cursar com lesão de parênquima cerebral normal, uma vez que não apresenta selectividade para as células tumorais.

Disrupção bioquímica

Esta técnica é menos invasiva que a anterior e possivelmente mais fiável, uma vez que afecta directamente a vasculatura tumoral. É conhecido que diversos mediadores inflamatórios, como os leucotrienos, histamina ou péptidos vasoactivos causam alteração transitória da permeabilidade vascular, tal como a bradicinina, um peptídeo vasodilatador. Esta substância actua na BHE através da activação dos receptores B2 das células endoteliais [47]. Estudos prévios demonstram que o agonista da bradicinina, RMP-7, consegue permeabilizar a BHE de forma segura. Através da utilização de modelos animais procedeu-se à comparação dos efeitos do RMP-7 a nível tumoral, parênquima cerebral proximal ao tumor, e parênquima distal. Num desses estudos, o efeito da permeabilização da BHE foi analisado em combinação com a utilização de três agentes (carboplatina, dextrano, BCNU), verificando-se que o RMP-7 aumentou a permeabilidade aos agentes hidrofílicos (carboplatina e dextrano). Verificou-se também que existiu um maior aumento da permeabilidade na barreira hemato-tumoral que na BHE íntegra. O RMP-7 não apresentou qualquer impacto significativo no que concerne à permeabilização da BHE para o agente lipossolúvel BCNU [47]. Outro estudo realizado tentou avaliar o impacto da utilização de IA RMP-7 associado à carboplatina para o tratamento de tumores do SNC, no entanto foi descontinuado devido aos elevados níveis de toxicidade [48].

A utilização de determinados vasomoduladores, nomeadamente agonistas dos canais de potássio, com vista à disponibilização dirigida de agentes quimioterapêuticos, tendo em conta o efeito promotor do transporte vesicular, foi também estudada. Esta estratégia bioquímica aumentou a permeabilidade da BHT, aumentando o aporte de fármaco selectivamente às células tumorais, apresentando apenas valores residuais nas restantes células cerebrais saudáveis [24], demonstrando selectividade para as células tumorais, contrariamente ao verificado aquando da utilização do RMP-7.

Disrupção ultra-sónica

As duas técnicas anteriormente apresentadas, apesar de demonstrarem resultados encorajadores, apresentam também alguns efeitos indesejados, relacionados principalmente com a disrupção não selectiva de um grande volume cerebral, uma vez que a permeabilização da BHE ocorre de forma generalizada e os agentes terapêuticos que atravessam a barreira permeabilizada têm efeitos adversos por acumulação no SNC, sendo a BHE permeabilizada transitoriamente em toda a área vascularizada pela artéria infundida, apresentando uma disrupção difusa da BHE. Não apresentam capacidade de disrupção localizada de pequenas áreas, sendo essa apenas atingida através de injecção de agentes directamente na região pretendida. Consequentemente, surge a necessidade de desenvolvimento de uma técnica de disrupção não invasiva, localizada, reversível e segura [49].

Foi observada DBHE em modelos animais sujeitos a disrupção experimental recorrendo a ultra-sons [50-52]. Apesar deste fenómeno ter sido descoberto no final da década de 50 do século passado, foi explorado por Patrick *et al.* como método de disponibilização de agentes quimioterapêuticos para tratamento de tumores do SNC, cerca de 30 anos após a sua descoberta [53]. Surge assim uma técnica de disrupção selectiva e localizada, reversível, não invasiva e guiada por meios imagiológicos que permite uma infusão direccionada anatómica ou funcionalmente, enquanto, ao mesmo tempo, preserva a restante BHE, mantendo-a intacta e impedindo a acumulação de agentes nocivos e causadores de neurotoxicidade [49] (figura 4).

Um dos principais problemas relacionados com a utilização desta técnica é a atenuação do efeito acústico por parte do crânio, ou assim se pensava [23]. Durante muito tempo foi defendida a criação de uma janela acústica óssea, no entanto, estudos recentes, demonstram que esta modalidade de tratamento também pode ser aplicada focalmente

utilizando uma via transcraniana por *array* de grande superfície ou através de *arrays* intermitentes e correcção de amplitude [54]. Foi também proposto que a redução de distorções causadas pelo osso pode ser obtida através da redução da frequência da onda ultra-sónica utilizada, consequentemente aumentando o comprimento de onda da mesma. No entanto, Hynynen *et al.* demonstraram que a utilização de frequências mais baixas (na ordem dos 250-300 kHz) permite focalização através do crânio sem distorções significativas [55]. A utilização de frequências mais baixas reduz também o dano tecidular permanente [49]. Esta técnica de disrupção pode ser utilizada recorrendo à RMN como coadjuvante, permitindo assim a verificação da DBHE (através do extravasamento de contraste local), permitindo também uma melhor localização da zona a permeabilizar. A utilização de sistemas guiados por RMN para ablação de tumores malignos também se encontra em estudo [56].

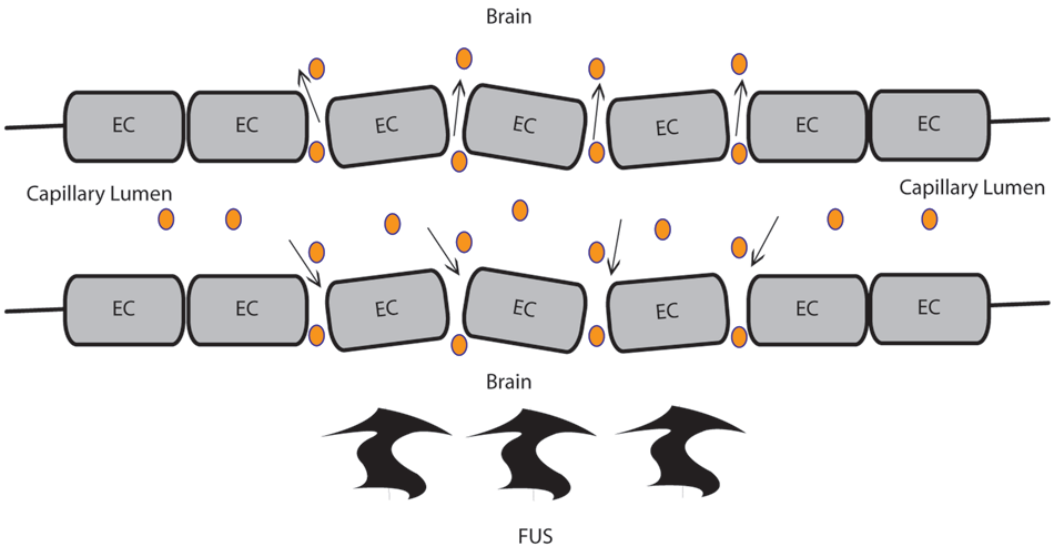

Figura 5 – Demonstração esquemática da DBHE através da utilização de microbolhas sujeitas a um campo acústico, adaptado de Etame, A.B., et al., Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology. Neurosurg Focus, 2012. 32(1): p. E3 [49]

Sheikov *et al.* e Hynynen *et al.*, através de verificação por técnicas de microscopia electrónica, sugerem como mecanismos de DHBE ultra-sónica a ruptura vascular, associada a

extravasamento de células sanguíneas; a laxidão das TJ e o aumento do transporte vacuolar transendotelial [57, 58].

No que concerne à laxidão das TJ, Sheikov *et al.* analisaram o impacto da irradiação acústica na integridade molecular das TJ [59], verificando-se que, através da medição da expressão proteica (proteínas juncionais, nomeadamente ocludina, claudina-1, claudina-5, ZO-1) por técnicas de imunoelectromicroscopia, se presenciou a desintegração dos complexos juncionais, comprovado através da redistribuição de componentes vasculares e perda de sinais imunológicos para a ocludina, claudina-5 e ZO-1. Verificou-se também que 6 horas após a irradiação sonora, não existia extravasamento através da BHE, bem como existiam TJ com expressão proteica normalizada, como pode ser observado no gráfico 1, comprovando a transitoriedade desta disrupção e consequente manutenção da integridade juncional.

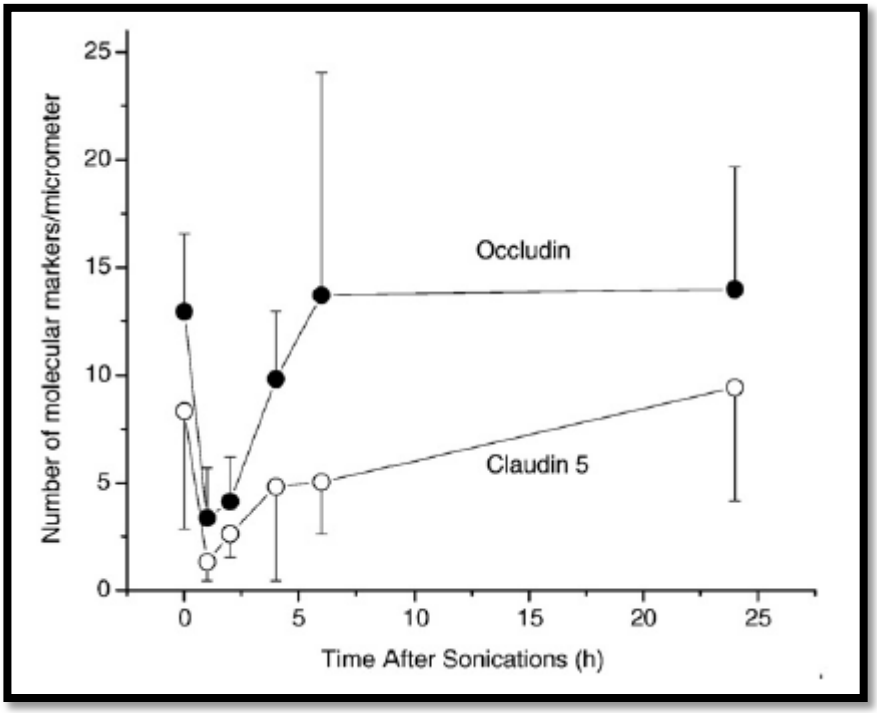

Gráfico 1 – Número de proteínas da TJ (ocludina e claudina 5) em função do tempo antes e após aplicação do campo acústico através de um crânio intacto, adaptado de Hynynen, K., Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(10): p. 1209-17 [23]

O aumento do transporte vacuolar transendotelial foi verificado por Sheikov *et al.* em modelos animais. A densidade pinocítica média encontrava-se cerca de uma ordem de grandeza acima em artérias sujeitas à aplicação de um campo acústico, quando comparadas com artérias não irradiadas. Por outro lado, a utilização do campo acústico não aumenta a densidade pinocítica média a nível capilar e amenta ligeiramente a nível das vénulas, sugerindo a existência de transporte transcitoplasmático nos microvasos pré-capilares [60]. Esta observação também já tinha sido verificada por Ningaraj *et al.* aquando da disrupção da BHE recorrendo a vasomoduladores, nomeadamente agonistas dos canais de potássio [24].

Verificou-se também que, na presença de contraste intravascular para RMN (MION-47), o extravasamento era maior durante períodos de irradiação acústica. Estes resultados, associados a electromicroscopia e microscopia de fotão duplo, demonstram que moléculas grandes podem atravessar a BHE quando em circulação durante uma irradiação acústica.

A DBHE evidenciada poderá servir como coadjuvante à terapêutica de neoplasias do SNC, facilitando o atingimento de concentrações terapêuticas de diversos agentes. O primeiro estudo a debruçar-se sobre esta temática verificou que, através da utilização de doxorubicina lipossomal, que normalmente não atravessa a BHE, com aplicação de um campo acústico, se atingiram níveis terapêuticos em modelos animais [61] (tabela II). Num estudo de seguimento da população de ratos irradiada, demonstrou-se um benefício terapêutico substancial [49].

Mei *et al.* investigaram a biodisponibilização de metotrexato IV recorrendo a DBHE ultra-sónica em modelos animais, comparando-o com infusão intra-carotídea. Verificaram uma maior concentração na área irradiada, cerca de 10 vezes superior à concentração atingida quando a disrupção ultra-sónica não se encontrava associada. Verificaram também que esta técnica era mais eficaz no atingimento de concentrações mais elevadas que a infusão intra-carotídea isolada [62] (tabela II).

Mais recentemente, Liu *et al.* estudaram a disponibilização de BCNU (carmustina) mediada por DBHE ultra-sónica em modelos animais, verificando-se um aumento substancial na concentração deste fármaco em animais sujeitos a DBHE comparativamente aos não sujeitos. Concomitantemente, a progressão tumoral foi significativamente reduzida, verificando-se decréscimo do tamanho tumoral. Os autores demonstraram também um impacto positivo na sobrevida da população estudada. Este estudo demonstra que esta estratégia terapêutica constitui uma forma não invasiva, selectiva e reversível de disponibilização dirigida de carmustina, aumentando selectivamente a concentração tumoral, suprimindo significativamente o crescimento tumoral e aumentando a sobrevida [63] (tabela II).

É necessário ainda um melhor conhecimento acerca dos efeitos secundários, aparentemente reversíveis e transitórios, não acompanhados de dano neuronal permanente, e da eficácia da técnica, apesar da segurança deste método se encontrar demonstrada [64, 65].

A utilização de ultra-sons com objectivo de DBHE pode ocorrer de diversas formas, nomeadamente térmica, através de efeito de cavitação ou através da utilização de contrastes ecográficos, nomeadamente micro-bolhas, que serão brevemente abordadas seguidamente.

Autores	Resultado
Kinoshita *et al.* [66]	Disponibilização cerebral de anticorpos para o receptor D4 da dopamina
Sheikov *et al.* [49]	Disponibilização selectiva de vector HSV através da BHE de ratos normais
Kinoshita *et al.* [67]	Disponibilização de herceptina (anticorpo monoclonar anti-HER2)
Treat *et al.* [61]	Biodisponibilização aumentada de doxorubicina através de BHE em ratos saudáveis.
Treat *et al.* [68]	Biodisponibilização aumentada de doxorubicina através da BHE em modelos de glioma, em ratos
Mei *et al.* [62]	Biodisponibilização aumentada de doxorubicina através da BHE em coelhos saudáveis
Liu *et al.* [63]	Biodisponibilização aumentada de carmustina associada a DBHE ultra-sónica conduziu a remissão tumoral e aumento da sobrevida em modelos de glioma em ratos
Liu *et al.* [69]	Utilização nanopartículas conjugadas a epirubicina associada a DBHE ultra-sónica conduz a um aumento no aporte, remissão tumoral e aumento da sobrevida em modelos de glioma em ratos

Tabela II – Estudos pré-clínicos em modelos animais de DBHE ultra-sónica associada a disponibilização de fármacos através da BHE, adaptado de Etame, A.B., et al., Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology. Neurosurg Focus, 2012. 32(1): p. E3.[49]

Efeito térmico

Patrick *et al.* demonstraram que a BHE se encontra permeável em redor de lesões térmicas induzidas por ultra-sons, tal não acontecendo quando a exposição não resulta em coagulação. Esta DBHE térmica foi posteriormente estudada, no entanto, foi invariavelmente associada a lesão tecidular [53, 70]. Em culturas, a utilização de temperaturas elevadas conseguiu atingir um efeito de DBHE reversível [71].

Efeito de cavitação

O fenómeno de cavitação corresponde à formação e imediata implosão de cavidades num líquido, consequência das forças que actuam sobre o líquido, nomeadamente a sujeição à acção de um campo acústico.

Vikhodtseva *et al.* descreveram que a curta exposição a feixes de intensidade elevada, acima do limiar de cavitação, causa disrupção da BHE, por vezes sem lesão tecidular, mas estes resultados não são reprodutíveis consistentemente [72]. Resultados similares foram atingidos com pulsações na ordem dos 2MHz, no entanto a associação com cavitação não foi estabelecida, existindo evidência clínica que a irradiação acústica causa disrupção da BHE [73]. Outro estudo clínico, cujo objectivo era a avaliação da eficácia da irradiação contínua com ultra-sons de baixa frequência (na ordem dos 300 kHz) associada à administração IA de tPA como método trombolítico, verificou que, após análise recorrendo à TAC com contraste, que a BHE se encontrava permeabilizada. No entanto, não era clara a presença de lesão tecidular ou se esta DBHE se deveu a cavitação causada por pulsação de ondas de baixa frequência associada a administração de fluido [23].

A disrupção não invasiva e reversível da BHE através deste método foi demonstrada por Hynynen *et al.* em 2001, através da utilização de contraste ecográfico com micro-bolhas pré-formadas, administrado por via sistémica. A DBHE ultra-sónica guiada por RMN é uma técnica capaz de produzir alteração da permeabilidade vascular sem causar dano tecidular [74]. Estes resultados foram obtidos após aplicação de *stress* mecânico localizado a microbolhas pré-formadas injectadas, através de ultra-sons pulsáteis localizados, sendo reversível ao final de 24 horas [64].

Tal como referido anteriormente, este método utiliza micro-bolhas pré-formadas (contêm gás, nomeadamente ar ou perfluorocarbono; frequentemente estão encapsuladas em albumina ou lípidos; têm diâmetros de cerca de 1-5 μm, de forma a poderem atravessar os capilares sanguíneos) infundidas na corrente sanguínea, previamente à irradiação acústica. Pensa-se que estas bolhas actuam como concentradores de energia e, uma vez que se encontram confinadas à corrente sanguínea, os efeitos biológicos induzidos limitam-se à parede dos vasos que as contêm e à área abrangida pelo cone acústico ultra-sónico [23, 64]. Quando as micro-bolhas circulam através do volume de tecido sujeito ao cone acústico, estas expandem e contraem à frequência da onda acústica que as irradia, devido a reduções e aumentos da pressão relacionados com a propagação da onda. As oscilações das bolhas causam movimento do fluido que as circunda, gerando micro-correntes e elevadas forças de cisalhamento na região envolvente [75]. Além disso, as bolhas são sujeitas ao efeito de uma força radiária que existe na direcção da propagação da onda acústica [56]. A utilização destas bolhas permite a utilização de frequências mais baixas, minimizando o risco de dano tecidular [49]. Acima de um limiar, estas bolhas tornam-se tão grandes que a inércia do fluido circulante induz o colapso da bolha, através de um fenómeno de cavitação. Este fenómeno

induz elevadas temperaturas, pressões e resulta na propagação radiária de uma onda de choque supersónica [23, 76], resultando em DBHE (figura 5). O grau de DBHE é tanto maior quanto maior a concentração de micro-bolhas [61]. No entanto, caso as bolhas colapsem junto da parede vascular, as correntes rápidas resultantes podem induzir punção da parede do vaso, cursando com extravasamento do conteúdo vascular e consequente lesão tecidular [23].

As micro-bolhas emitem sinais acústicos secundários à irradiação primária, correlacionados com DBHE na ausência de dano vascular, sugerindo assim que estes sinais acústicos emitidos podem ser utilizados na avaliação da segurança do método [49].

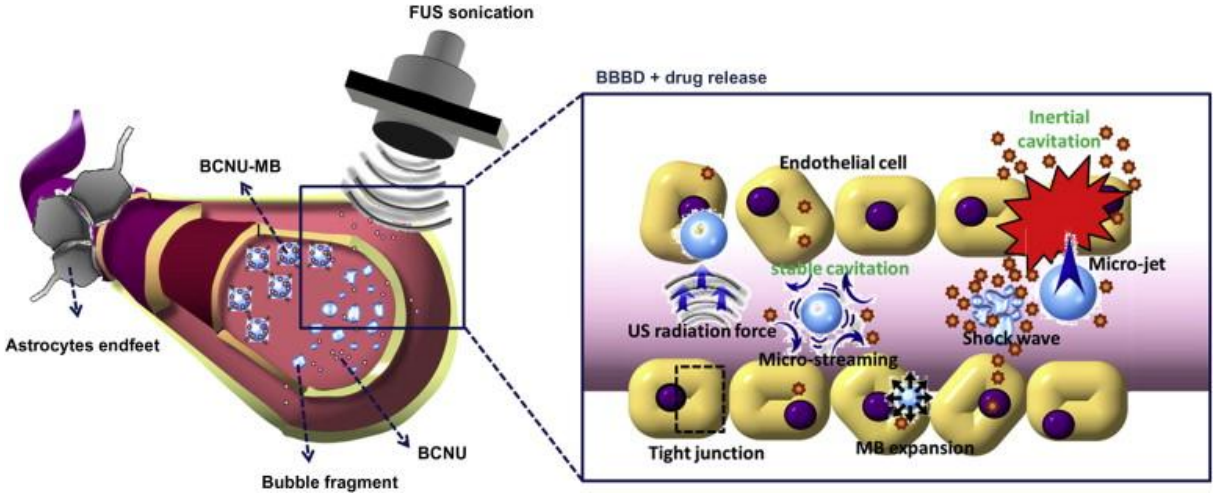

Figura 6 – Demonstração esquemática da hipótese relacionada com a utilização de DBHE ultra-sónica associada à utilização de micro-bolhas, neste caso recorrendo à utilização concomitante de carmustina. Adaptado de Ting, C.Y., et al., Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. Biomaterials, 2012. 33(2): p. 704-12 [77]

Esta modalidade de disrupção da BHE assume um papel importante como potencial interveniente terapêutico no tratamento de neoplasias do SNC. A demonstração por Raymond *et al.* veio potenciar esta ideia, sugerindo duas vias de extravasamento de conteúdo intravascular sem extravasamento de células sanguíneas [78]. Os autores propõem assim duas possíveis vias de disrupção da BHE: uma através de lesão punctiforme, possivelmente explanada pelo referido colapso de bolhas a curta distância da parede vascular e que causa

fluxos rápidos que puncionam o vaso; outra através de células endoteliais intactas. Verificou-se que após a emissão da onda acústica, quase invariavelmente existia uma constrição arterial seguida de uma libertação lenta do contraste utilizado no estudo, tendo o contraste de menor peso molecular uma taxa de libertação mais rápida que o de maior peso, tal como seria expectável. Não foi possível identificar se a causa da vasoconstrição pode ser atribuída directamente à DBHE ou se é um efeito da irradiação acústica. No entanto, a estimulação mecânica causada pela força radiária consequente à irradiação acústica é a causa mais provável [23]. Um possível mecanismo através do qual a DBHE ocorre é através da hipóxia. É conhecido que a alteração no estado de oxigenação das células endoteliais cursa com alterações transitórias na permeabilidade cérebro-vascular [79]. É sugerido assim que a vasoconstrição previamente referida possa reduzir temporariamente a oxigenação num intervalo suficiente para induzir a activação de receptores relacionados com a isquemia, culminando na alteração da permeabilidade da BHE.

Em 2012, Yang *et al.* verificaram a disrupção da BHE através da utilização de ultra-sons focalizados e micro-bolhas, em modelos animais, demonstrando o aumento da permeabilidade da BHE e concluindo que este poderá ser um método com vantagens na utilização sinérgica com vista à disponibilização de agentes terapêuticos em regimes de tratamento de tumores cerebrais [80].

Esta técnica apresenta-se assim como uma forma não invasiva, reversível, segura e selectiva de disponibilização focalizada de fármacos, não induzindo uma permeabilização generalizada com adveniente neurotoxicidade. No entanto, a existência de efeitos secundários ainda não é completamente compreendida, sendo necessário desenvolver mais esforços no sentido de verificar qual o potencial efeito deletério da utilização deste método com potencial terapêutico.

Disponibilização directa

A maioria dos métodos utilizados no tratamento de tumores cerebrais tem como base conceptual a administração de uma terapêutica sistémica. No entanto, de forma a atingir concentrações terapêuticas a nível tumoral, é necessária a administração de altas doses de agentes farmacológicos, resultando em toxicidade generalizada. Neste sentido, foram desenvolvidas estratégias de disponibilização farmacológica que não recorrem ao sistema circulatório como veículo primordial de biodisponibilização, contornando a BHE através de métodos físicos.

A disponibilização intersticial de fármacos apresenta-se como uma técnica conceptualmente relevante uma vez que representa o meio mais directo de evitar a permeabilidade selectiva da BHE. Além disso, a administração directa no parênquima tumoral permite a superação da pressão intersticial elevada produzida pelos tumores cerebrais. Os gradientes de concentração de fármaco e o de pressão intersticial favorecem uma distribuição do centro do tumor para a periferia, através de uma combinação de convecção e difusão. Esta biodisponibilização directa pode ser atingida através de diversas vias, nomeadamente polímeros implantáveis de libertação controlada, sistemas de disponibilização intra-cavitária ou CED [30].

Alguns estudos clínicos recorreram à utilização de polímeros implantáveis e biodegradáveis com o intuito de tratar directamente tumores cerebrais. A base conceptual é a utilização de uma libertação continuada de fármaco através da utilização de uma matriz implantável, com uma taxa de libertação de fármaco constante e controlada.

Brem *et al.* estudaram o tratamento de gliomas através da utilização de matrizes biodegradáveis impregnadas de carmustina. A disponibilização de fármaco ocorre através de uma combinação de difusão e degradação hidrolítica do polímero [81]. No entanto, a carmustina só pode ser utilizada aquando da realização de ressecções tumorais grandes, sendo o polímero implantado nos bordos da ressecção. Os resultados iniciais deste estudo clínico randomizado revelaram que existiu um aumento no tempo de sobrevida média em pacientes com glioma recorrente. Apesar destes dados encorajadores, os benefícios são modestos, de curta duração e o risco de toxicidade não é negligenciável. Existem estudos a ser realizados com outros agentes, nomeadamente paclitaxel, adriamicina, 5-fluorouracilo, mitomicina, hidrocloreto de nimustina e mitoxantrona [30, 82-85].

As principais desvantagens desta técnica incluem o aumento do risco de neurotoxicidade focalizada devido a elevadas concentrações de polímero ou de fármaco, cicatrização difícil ou deficitária e baixa perfusão de fármaco além da cavidade de ressecção, falhando-se assim a terapêutica por atingimento de concentrações sub-óptimas [49]. Estes sistemas têm um efeito de espectro muito limitado, eficazes apenas em pequenos tumores [2], sendo ineficazes em tumores de maiores dimensões uma vez que não atingem os nichos de células tumorais que existem a alguma distância do centro do tumor, necessitando também de uma ressecção alargada, o que nem sempre é possível.

Sistemas de Biodisponibilização Intra-Cavitários

A utilização de sistemas intraventriculares ou intracavitários, como através do reservatório de Ommaya, permite a administração de bólus intermitentes de agentes de quimioterapia directamente no tecido tumoral. Outros mecanismos, que permitem a disponibilização de uma infusão constante a uma taxa pré-definida à loca tumoral através de um cateter externo e fármacos como a nitrosureia ou o metotrexato foram utilizados em alguns ensaios clínicos com bons resultados [12].

Os principais efeitos adversos desta técnica relacionam-se com processos infecciosos, obstruções do cateter, limites inadequados de distribuição de fármaco, além de um elevado custo e agressividade do método [2], não sendo um método selectivo, podendo levar a neurotoxicidade por afecção de células saudáveis, desencadeando aracnoidites, meningites e lesões neurológicas focais [12]. Apesar de referido por alguns estudos, este método não constitui uma verdadeira forma de DBHE, uma vez que a injecção intra-cavitária não assegura a passagem através da BHE ou BHT, podendo por vezes atingir apenas as regiões periventriculares [2].

Disponibilização mediada por convecção – CED

Em 1994, Bobo *et al.* idealizaram uma forma de disponibilização local e regional, cujo mecanismo potenciador era a convecção e a existência de difusão farmacológica com base em diferentes gradientes de pressão. Esta abordagem consiste na injecção contínua, a pressão positiva, de um soluto contendo agente terapêutico. A existência deste gradiente de pressão, entre o soluto infundido, a pressão mais elevada, e o parênquima cerebral, com pressões mais baixas, permite a disponibilização de fármacos ao SNC. Este fluxo de massa é criado através

do estabelecimento de um pequeno gradiente de pressão, originado devido à acção de uma bomba que impulsiona o soluto através de um cateter dirigido a uma área específica do SNC [12, 30].

Este método consiste na inserção estereotáxica de um ou mais cateteres, através de trepanação craniana. Estes cateteres, após avaliação imagiológica, são inseridos junto da zona hiper-captante ou do tecido infiltrativo circundante. Uma bomba de infusão inicia um fluxo de pressão, sendo assim o agente terapêutico infundido directamente na área desejada, com uma taxa de libertação, concentração a atingir e duração pré-definidas. A estrutura poro-elástica da árvore vascular do SNC permite, com o estabelecimento deste gradiente de pressão, a passagem de moléculas de diferentes pesos moleculares [30].

A distribuição do fármaco infundido é influenciada por diversos factores, nomeadamente pela taxa de infusão, diâmetro da cânula, o volume infundido, a pressão do fluido intersticial, características da molécula terapêutica e até mesmo da estrutura tecidular do tumor. Após a infusão, o fluxo de massa é disperso por diversas vias, sendo a distribuição do fármaco determinada pela difusão do mesmo, perda capilar e metabolismo. Outros factores que podem influenciar esta distribuição relacionam-se com características do cateter, nomeadamente com o dano tecidular por este causado, refluxo de soluto na região próxima da inserção do cateter e ainda com a passagem de bolhas de ar, que podem ter efeitos imprevisíveis e indesejados no que concerne à distribuição do fluxo infundido. A principal consequência do refluxo intrínseco relaciona-se com criação de um circuito de difusão de fármaco através do trajecto de entrada do cateter, podendo tal conduzir a uma distribuição generalizada de soluto e fármaco no espaço subaracnóide, limitando, consequentemente, a distribuição farmacológica na área desejada e aumentando o potencial efeito deletério da terapêutica por aumento da possibilidade de neurotoxicidade [30].

Este método apresenta algumas vantagens comparativamente com outros métodos de biodisponibilização farmacológica directa, uma vez que permite ultrapassar o obstáculo constituído pela BHE, facilitando a difusão de agentes terapêuticos de diversos pesos moleculares; permite também uma disponibilização focalizada e relativamente selectiva, uma vez que a área abrangida pelo fluxo de massa originado está directamente relacionada com o local onde o cateter se encontra inserido, actuando também assim como uma forma de contenção dos efeitos deletérios, como a neurotoxicidade por um lado, ou a toxicidade sistémica, por outro [12].

A existência de uma pressão do fluido intersticial mais elevada e alterações na permeabilidade da BHE na região tumoral e peritumoral facilitam a criação de um gradiente de pressão que pode, conceptualmente, promover a difusão do agente terapêutico de zonas de maior pressão, como a região tumoral alvo, para zonas de menor pressão, como o parênquima peritumoral normal. Este gradiente de pressão secundário e a própria distribuição heterogénea de fármaco no interior do tumor são factores limitantes à utilização deste método de disrupção [86].

Chen *et al.* verificaram que este método, contrariamente ao que poderia ser expectável com a infusão de solutos e aumento do volume da circulação cerebral, não resulta em edema cerebral ou aumento da pressão intra-craniana [87].

Lidar *et al.* estudaram a segurança e eficácia da administração de paclitaxel associado a DBHE por CED em modelos de GBM, verificando que dos 15 indivíduos sujeitos a 20 ciclos de CED intratumoral com paclitaxel, 5 apresentaram uma resposta completa e 6 uma resposta parcial, num total de 73% de resposta à terapia. Concluíram que o paclitaxel associado a CED apresenta uma taxa de resposta anti-tumoral elevada, estando no entanto associado a complicações relacionadas com o tratamento [88] (tabela III). Saito *et al.*

analisaram a disponibilização de um inibidor da topoisomerase I (topotecano) lipossomal associado a CED, verificando um aumento na sobrevida [89] (tabela III).

A associação de CED com outra classe de agentes anti-tumorais, as imunotoxinas produzidas por bactérias tem sido investigada. Estas moléculas apresentam elevada actividade citotóxica, podendo ser associadas a transportadores e estes a populações celulares específicas, constituindo assim uma modalidade terapêutica altamente dirigida e selectiva. Esta especificidade transportador-ligando cria uma selectividade tumoral, através do reconhecimento de receptores de superfície células tumorais, promovendo a ligação do complexo transportador-toxina antes até da sua entrada na célula. Estas toxinas têm a vantagem de constituírem agentes citotóxicos mais potentes que os actuais agentes de quimioterapia, no entanto, tal representa um risco, uma vez que a única forma de administração segura é através de administração directa ou através deste mecanismo de transportador-toxina [30]. Alguns estudos, os respectivos agentes utilizados e conclusões encontram-se resumidos na tabela III.

Estudo	Agente terapêutido administrado por CED		Conclusão
Hadaczek *et al.* [90]	Vectores virais (AAV2)		Método é eficaz na disponibilização de vector AAV2 e da informação genética que este vector transporta
Lidar *et al.* [88]	Paclitaxel		Resposta anti-tumoral elevada, mas elevado número de complicações associadas
Saito *et al.* [89]	Topotecano lipossomal		Aumento da sobrevida
Laske *et al.* [91]	Imunotoxinas dirigidas	Transferrina/toxina difteria (TF-CRM107)	Estudos de fase I e II demonstraram boas respostas tumorais, sem neurotoxicidade significativa. Estudo randomizado de fase III interrompido por menos de 20% de probabilidade de resultado positivo do estudo.
Vogelbaum *et al.* [92]	Imunotoxinas dirigidas	IL-13/forma truncada da exotoxina de pseudomonas (PE) (IL13-PE38QQR)	Sobrevida média comparável à da utilização de Gliadel® (carmustina). Estudo randomizado de fase III falhou o objectivo de demonstrar um aumento da sobrevida em 50%
Vogelbaum *et al.* [93]	Imunotoxinas dirigidas	IL13-PE38QQR	Estudo de fase I, utilização da toxina, radioterapia e uso variável de temozolomida, constitui um regime bem tolerado.
Weber *et al.* [94]	Imunotoxinas dirigidas	IL4-PE38KDEL	Aumento da sobrevida média. Prosseguem estudos com este agente.
Sampson *et al.* [95]	Imunotoxinas dirigidas	TP38 (PE38-TGFα-EGFR ligando)	Eficácia terapêutica demonstrada em modelo tumoral murino intracraniano atímico após implantação de linhagem tumoral A431 no núcleo caudado. Revela perfil de toxicidade aceitável. Estudo de fase III programado.

Tabela III – Diversos estudos de disponibilização de agentes terapêuticos com associação de disponibilização mediada por convecção/CED. Adaptado de Bidros, D.S. and M.A. Vogelbaum, Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. Neurotherapeutics, 2009. 6(3): p. 539-46 [30]

Nanotecnologia

Recentes aplicações nanotecnológicas demonstraram potencial terapêutico no que concerne ao tratamento tumoral [96]. As características específicas das nanopartículas poderão ser utilizadas de forma terapêutica. No entanto, a BHE continua a ser um dos principais impedimentos às plataformas nanotecnológicas. Por exemplo, a utilização de nanoparticulas de ouro ganhou alguma relevância terapêutica quando utilizada no tratamento de neoplasias fora do SNC, no entanto a sua biodisponibilidade cerebral é extremamente baixa quando administrados a nível sistémico [49, 97]. Consequentemente, estratégias como a DBHE ultra-sónica, que aumenta a permeabilidade a nanotransportadores, podem coadjuvar a implementação de terapêuticas nanotecnológicas de tumores do SNC.

Liu *et al.* avaliaram recentemente o impacto da administração de nanopartículas magnéticas associadas a um agente anti-neoplásico, a epirubicina (tabela II), associada a DBHE ultra-sónica em modelos animais. Foram utilizadas estas nanopartículas magnéticas devido aos benefícios imagiológicos advenientes do uso de RMN. Verificou-se um acúmulo substancial de nanopartículas e consequentemente de epirubicina, em níveis cerca de 15 vezes superiores aos atingidos com administração sistémica de epirubicina associada a DBHE ultra-sónica [69]. Demonstrou-se uma diminuição na progressão tumoral. De forma semelhante, Etame *et al.* também demonstraram um aumento da concentração parenquimatosa de nanopartículas de ouro revestidas de polietilenoglicol [98].

A utilização destas partículas, principalmente se forem magnetizadas, associada a técnicas de ressonância magnética permite, através de fenómenos de electromagnetismo, uma maior localização de agentes terapêuticos à área tumoral. Esta técnica ainda se encontra em investigação, no entanto, caso se verifique o seu potencial terapêutico, apresenta elevada relevância uma vez que ao permitir direccionar a terapia a qualquer parte do corpo inicia uma

nova modalidade de tratamento que pode ser transversalmente aplicada a neoplasias sistémicas e não apenas cerebrais. Essa focalização terapêutica permite também uma diminuição dos efeitos sistémicos indesejados [99].

DBHE associada a anticorpos

O desenvolvimento na área da biologia da célula tumoral levou a uma melhor compreensão dos diversos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento tumoral. Consequentemente, o crescente conhecimento acerca dos diversos intervenientes na carcinogénese permitiu o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes, actuando directamente no sistema de tradução de sinal e síntese proteica, característico de células com elevado índice replicativo, como as tumorais malignas, permitindo assim uma terapêutica dirigida, bem como uma diminuição da toxicidade sistémica.

Um dos principais impedimentos à terapêutica com anticorpos é a diminuta capacidade que estes têm de atravessar a BHE, na ausência de grandes canais de água ou mecanismos de transporte activo no endotélio cérebro-vascular [44]. A neuro-oncologia é uma das principais áreas científicas a beneficiar com a melhoria na compreensão do mecanismo de transporte de anticorpos através da BHE. Alguns estudos, apresentados seguidamente, revelam o sucesso da terapêutica com anticorpos monoclonais anti-tumorais de carcinomas sistémicos, que poderia ser aplicada a processos tumorais primários ou metastáticos do SNC.

A herceptina® (trastuzumab) é um anticorpo monoclonal humanizado que actua junto dos receptores 2 para o factor de crescimento epidérmico (EGFR) (HER2/c-erbB2), expresso em células tumorais de indivíduos com cancro da mama. Foi utilizada com sucesso no tratamento local e distal do cancro da mama, no entanto, uma vez que a molécula não

consegue atravessar a BHE, contribuiu para um aumento relativo da incidência de metastização cerebral, ou seja, a utilização deste fármaco reduziu a taxa de complicações sistémicas, não tendo, no entanto, impacto significativo no tratamento da metastização cerebral. Quando utilizada para tratamento de doença metastática extracraniana, existiu uma taxa de resposta de 71% [23]. Kinoshita *et al.* demonstraram a passagem deste anticorpo através da utilização de DBHE ultra-sónica guiada por RMN [67], apresentando resultados encorajadores e servindo como exemplo para extrapolação relativamente a outros agentes anti-tumorais. Caso este método seja implementado clinicamente, poderá ter um impacto significativo no tratamento da doença metastática. A mesma situação ocorre com o rituximab e o tratamento de LPSNC [23].

Kinoshita *et al.* [66] demonstraram a passagem de anticorpos para o receptor D4 da dopamina através da BHE, associada a uma técnica de disrupção da BHE recorrendo a pulsação ultra-sónica (tabela II), podendo tal ser utilizado na melhor compreensão dos mecanismos de transporte de anticorpos através da BHE.

A disrupção osmótica encontra-se associada a um aumento no *uptake* de anticorpos monoclonais [100].

Terapia génica associada à DBHE

Um dos maiores impasses à utilização de terapia génica em neoplasias do SNC é, tal como em outras terapias, a ineficácia de disponibilização de agente terapêutico. Diversas técnicas foram experimentadas, nomeadamente injecção intra-tumoral [101], mecanismos mediados por convecção [102] ou até mesmo administração intra-ventricular [103], no entanto, todas são invasivas e apresentam efeitos secundários relacionados com a neurotoxicidade. Por outro lado, a administração intravascular, apesar de segura, depara-se com o grande obstáculo constituído pela BHE, que impede a passagem dos vectores virais, frequentemente utilizados como condutos de informação genética neste contexto. Uma vez que a terapia génica nos casos de tumores cerebrais, nomeadamente o glioma, se dirige essencialmente a células que possam ter escapado a terapias locais, como a cirurgia ou radiocirurgia, é essencial o desenvolvimento de métodos específicos e dirigidos a estas células. A DBHE ultra-sónica poderá ter um papel importante nesta área. Um estudo realizado neste âmbito associou a utilização de DBHE ultra-sónica com disponibilização de vectores virais, HSV, radiomarcados. Foi demonstrada disponibilização localizada de HSV administrado IV no hemisfério sujeito à irradiação ultra-sónica [60].

Hadaczek *et al.* analisaram a utilização de vectores virais, AAV2, como forma de potencial aporte de terapia genética, através de CED, da timidina cinase AAV2 e da decarboxilase do ácido L-amino-aromático-AAV2, verificando que este método é eficaz na disponibilização de vector AAV2 e da informação que este vector transporta [90].

Avanços na área da engenharia genética, principalmente no que se refere à utilização de transgenes associada à disrupção ultra-sónica, permitiram a conceptualização de uma via de disponibilização de constructos de ADN, sendo uma alternativa aos vectores virais e dificuldades associadas. Endoh *et al.* já demonstraram a possibilidade de disponibilização de

genes associada a DBHE ultra-sónica [104]. Shimamura *et al.* demonstraram também um aumento da expressão de luciferase após administração do seu respectivo gene, associado à técnica de DBHE ultra-sónica com recurso a micro-bolhas [105].

Chen *et al.* elegantemente demonstraram a diminuição da expressão de survivina, uma proteína inibidora da apoptose expressa em gliomas malignos, através da utilização de DBHE ultra-sónica associada à administração de um vector silenciador shARN da survivina [106].

No entanto, apesar dos resultados encorajadores, este método carece de mais estudos que comprovem a sua eficácia funcional, bem como de uma melhor compreensão da genómica e proteómica tumoral, permitindo assim uma terapêutica dirigida mais eficazmente.

Discussão

A BHE compromete significativamente a terapêutica de carcinomas cerebrais. A incapacidade de contornar este mecanismo traduz-se na perda de um elevado número de vidas e em elevados custos, por todo o mundo. A compreensão da genómica e proteómica da vasculatura tumoral, comparativamente à vasculatura normal, assume um papel fulcral no desenvolvimento de novas estratégias de permeabilização transitória da BHE, e consequentemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A IA de agentes hiperosmóticos induz DBHE, apresenta algum grau de sucesso clínico, no entanto está associada a uma disrupção não selectiva da BHE, levando a uma disponibilização generalizada de potenciais tóxicos a tecido cerebral saudável, sendo que frequentemente se verifica a existência de efeitos secundários indesejados relacionados com a disrupção global da BHE. A administração IA de agentes de quimioterapia para o tratamento de tumores do SNC, quer em modelos animais ou ensaios clínicos, revela o atingimento de uma maior concentração do fármaco no tumor e área peri-tumoral e com muito menos toxicidade sistémica, quando comparada à via mais utilizada actualmente, a IV [29]. No entanto, apresenta-se como um método disruptivo invasivo, não selectivo, com potencial neurotoxicidade.

A CED, apesar dos diversos estudos realizados, inclusivamente ensaios clínicos, e apesar da sua eficácia demonstrada, constitui um método altamente agressivo de administração farmacológica, sendo invasivo, com melhores resultados em casos de tumores sólidos de pequenas dimensões [2] uma vez que, tal como a administração intra-cerebral, não permite o alcance terapêutico dos nichos celulares afastados do centro tumoral ou do local de emergência do cateter.

A disrupção bioquímica, principalmente se associada à utilização de vasomoduladores, demonstra aumento da permeabilidade da BHT, aumenta significativamente a disponibilização de fármacos à região tumoral, sem grande alteração na concentração nas células cerebrais normais e tem a capacidade de aporte de moléculas terapêuticas de peso molecular variável. Apresenta-se assim como um método aparentemente seguro, transitório e com elevada especificidade para as células tumorais, permitindo uma potencial terapêutica altamente dirigida. No entanto, há necessidade de mais estudos que comprovem o papel da disrupção bioquímica da BHE/BHT enquanto estratégia terapêutica.

Os dados pré-clínicos advenientes de estudos da cinética de vários fármacos a nível cerebral, em modelos animais, demonstram que a DBHE através de irradiação ultra-sónica e infusão de micro-bolhas é não invasiva, exequível, segura e facilita a disponibilização de diversos fármacos ao parênquima cerebral. A energia acústica necessária para produzir este efeito é inferior à necessária para causar um efeito térmico e consequente dano tecidular, podendo ser assim utilizada de forma segura através de um crânio intacto. Este método está associado com dano vascular e tecidular mínimo. Estes estudos também demonstraram uma ausência significativa de efeitos secundários. Observou-se a disponibilização localizada de anticorpos e agentes quimioterapêuticos, no entanto, a captação cerebral e a eficácia terapêutica carecem ainda de demonstração adequada [56]. A utilização desta técnica em modelos animais demonstrou correlações positivas entre um aumento da concentração de fármacos no parênquima cerebral e uma diminuição da progressão tumoral, com aumento da sobrevida concomitante [49]. A associação desta técnica com nanopartículas terapêuticas ou constructos genéticos, como vectores virais ou transgenes, apresenta um enorme potencial no que diz respeito a estratégias moleculares de tratamento neuro-oncológico. Esta técnica apresenta-se assim como uma forma não invasiva, reversível, segura e selectiva de disponibilização relativamente localizada de agentes terapêuticos. A existência de efeitos

secundários ainda não é completamente compreendida, sendo necessário desenvolver mais esforços no sentido de verificar qual o potencial efeito deletério da utilização deste método com potencial terapêutico. Mais estudos pré-clínicos bem-sucedidos ajudarão a pavimentar o caminho para o desenvolvimento de estudos clínicos [49].

As perspectivas de combinação de DBHE ultra-sónica com plataformas de disponibilização nanotecnológica criam elevadas expectativas no que concerne à terapia de tumores do SNC, inaugurando uma elegante nova forma de administração farmacológica. Estas nanopartículas já são extremamente atractivas como estratégia de terapêutica molecular uma vez que podem ser facilmente associadas a diversas moléculas, nomeadamente inibidores moleculares, proteínas, ácidos nucleicos, ligandos, anticorpos, entre outras [49], carecendo no entanto de mais estudos demonstrativos da sua eficácia bem como aperfeiçoamento dos mecanismos de selectividade celular, devendo os esforços focar-se no desenvolvimento de nanopartículas mais dirigidas para células tumorais, poupando as células saudáveis, assegurando assim uma diminuição dos efeitos deletérios relacionados com a actual inespecificidade desta técnica.

A disponibilização terapêutica com base em vectores transportadores de material genético, proteínas modificadas, ou até mesmo anticorpos manifesta-se como um método complexo e que pode, actualmente, disponibilizar as moléculas transportadas a células cerebrais normais, devendo estudos futuros forcar-se no desenvolvimento da especificidade vectorial.

A utilização de anticorpos e de imunotoxinas demonstrou alguns resultados animadores, principalmente na área da especificidade para células tumorais, podendo ser um método que permita uma maior selectividade no tratamento de processos tumorais do SNC.

Conclusão

Na última década ocorreram enormes avanços no desenvolvimento de estratégias de disponibilização dirigida de agentes terapêuticos às células tumorais, no entanto, existe uma lacuna no que respeita ao desenvolvimento de um método de DBHE não invasivo, selectivo, reversível e seguro, pelo que mais esforços deverão ser exercidos no sentido do desenvolvimento de uma forma de contornar os efeitos paradoxalmente deletérios da BHE.

Nesse sentido, diversas técnicas disruptivas foram conceptualizadas e desenvolvidas ao longo dos últimos anos, sendo que algumas conseguiram demonstrar aumento da concentração intra-parenquimatosa de agentes citotóxicos e terapêuticos, provando que estas técnicas têm potencial para assumir um papel preponderante no tratamento de carcinomas cerebrais.

Apesar desta evolução, o alcance de concentrações farmacológicas terapêuticas depende de diversos factores além da passagem através da BHE, nomeadamente a capacidade de captação de fármaco pelo tumor, o metabolismo intra-celular do fármaco, o *washout* do agente para o meio extra-celular ou para o LCR, a própria sensibilidade à quimioterapia e a existência de mecanismos de resistência.

Este conjunto de variáveis deverá ser abordado numa perspectiva holística e multidisciplinar, actuando no sentido de melhorar as vias de acesso ao SNC, nomeadamente através da melhoria das técnicas disruptivas abordadas neste trabalho, tornando-as mais seguras, diminuindo os efeitos secundários e aumentando a selectividade e capacidade de disponibilização focal, mas também através da melhoria das características físico-químicas dos fármacos utilizados, bem como através de um aprofundamento do conhecimento referente às características biológicas dos tumores do SNC e, consequentemente, uma melhor compreensão da cinética neuro-farmacológica, com adveniente melhor conhecimento acerca da estratégia mais eficaz de combate aos tumores cerebrais.

Futuro

O desenvolvimento de um método de DBHE focalizado, reversível e transitório, sem dano tecidular permanente associado ao desenvolvimento de fármacos tumor-específicos tem o potencial de, além de aumentar a resposta terapêutica no tratamento de neoplasias do SNC, diminuir significativamente a toxicidade actualmente vigente devido à falta de especificidade dos fármacos existentes. A busca destes princípios deverá continuar a ser o foco da investigação existente nesta área.

A capacidade de disponibilização de agentes mais específicos e eficazes através da BHE poderá ter um impacto extremamente significativo no tratamento de tumores do SNC, principalmente devido ao elevado número de doentes que poderão beneficiar deste tipo de terapêutica, tendo em conta os bons resultados que apresentam no tratamento de doença extracraniana.

A engenharia genética assume um papel importante na possível terapêutica futura, uma vez que já foi demonstrada a capacidade de disponibilização selectiva de material genético. Tal tecnologia poderá ser utilizada para disponibilização de genes deficitários em mutações tumorais ou disponibilização de genes silenciadores, como microARN, regulando assim a expressão de uma proteína aberrante. Estudos futuros focar-se-ão na determinação das diferenças existentes nos níveis de expressão (induzida ou diminuída) de certos genes ou proteínas, comparando células endoteliais normais e células endoteliais tumorais, actuando no sentido de direccionar a terapia a um nível molecular, atingindo principalmente as células tumorais e poupando as células cerebrais saudáveis.

Bibliografia

1. Omidi, Y. and J. Barar, *Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors.* BioImpacts, 2011. **2**(1): p. 5-22.
2. Ningaraj, N.S., *Drug delivery to brain tumours: challenges and progress.* Expert Opin Drug Deliv, 2006. **3**(4): p. 499-509.
3. Society, A.C., *Cancer Facts and Figures.* American Cancer Society, 2013.
4. Dermietzel, R., D. Spray, and M. Nedergaard, *Blood-Brain Barriers: From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Vol. I. 2006: WILEY-VCH.
5. Deeken, J.F. and W. Loscher, *The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1663-74.
6. Lee, S.W., et al., *Blood-brain barrier interfaces and brain tumors.* Arch Pharm Res, 2006. **29**(4): p. 265-75.
7. Milner, R., et al., *Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit.* Stroke, 2008. **39**(1): p. 191-7.
8. de Vries, N.A., et al., *Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors.* Expert Rev Neurother, 2006. **6**(8): p. 1199-209.
9. Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development.* NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 3-14.
10. Dore-Duffy, P., *Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier.* Curr Pharm Des, 2008. **14**(16): p. 1581-93.
11. Daneman, R., et al., *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis.* Nature, 2010. **468**(7323): p. 562-6.
12. Blakeley, J., *Drug delivery to brain tumors.* Curr Neurol Neurosci Rep, 2008. **8**(3): p. 235-41.

13. Bart, J., et al., *The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation.* Cancer Treatment Reviews, 2000. **26**(6): p. 449-462.

14. Rosenberg, G.A., *Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier.* J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(7): p. 1139-51.

15. Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard, *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications.* Neurobiol Dis, 2004. **16**(1): p. 1-13.

16. Lai, C.H. and K.H. Kuo, *The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte.* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **50**(2): p. 258-65.

17. Jones, A.R. and E.V. Shusta, *Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation.* Pharm Res, 2007. **24**(9): p. 1759-71.

18. Levin, V.A., *Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability.* J Med Chem, 1980. **23**(6): p. 682-4.

19. Mahar Doan, K.M., et al., *Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(3): p. 1029-37.

20. Awasthi, S., et al., *RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy.* BMC Neurosci, 2005. **6**: p. 61.

21. Regina, A., et al., *Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier.* Cancer Metastasis Rev, 2001. **20**(1-2): p. 13-25.

22. Szabo, D., et al., *Reversal of multidrug resistance of tumor cells.* Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4261-74.

23. Hynynen, K., *Ultrasound for drug and gene delivery to the brain.* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(10): p. 1209-17.

24. Ningaraj, N.S., et al., *Regulation of blood-brain tumor barrier permeability by calcium-activated potassium channels.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **301**(3): p. 838-851.

25. Muldoon, L.L., et al., *Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check.* J Clin Oncol, 2007. **25**(16): p. 2295-305.

26. Vinolas, N., et al., *Pre-irradiation semi-intensive chemotherapy with carboplatin and cyclophosphamide in malignant glioma: a phase II study.* Anticancer Drugs, 2002. **13**(2): p. 163-7.

27. Folkman, J., *Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease.* Nature Medicine, 1995. **1**(1): p. 27-31.

28. Ningaraj, N.S., M.K. Rao, and K.L. Black, *Adenosine 5 '-triphosphate-sensitive potassium channel-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase in a rat brain tumor model.* Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8899-8911.

29. Guillaume, D.J., et al., *Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: results of a phase I study.* Neurosurgery, 2010. **66**(1): p. 48-58; discussion 58.

30. Bidros, D.S. and M.A. Vogelbaum, *Novel drug delivery strategies in neuro-oncology.* Neurotherapeutics, 2009. **6**(3): p. 539-46.

31. Angelov, L., et al., *Blood-brain barrier disruption and intra-arterial methotrexate-based therapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma: a multi-institutional experience.* J Clin Oncol, 2009. **27**(21): p. 3503-9.

32. Williams, P.C., et al., *Toxicity and efficacy of carboplatin and etoposide in conjunction with disruption of the blood-brain tumor barrier in the treatment of intracranial neoplasms.* Neurosurgery, 1995. **37**(1): p. 17-27; discussion 27-8.

33. Fortin, D., et al., *Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis.* Cancer, 2007. **109**(4): p. 751-60.

34. Dropcho, E.J., et al., *Phase II study of intracarotid or selective intracerebral infusion of cisplatin for treatment of recurrent anaplastic gliomas.* J Neurooncol, 1998. **36**(2): p. 191-8.

35. Ashby, L.S. and W.R. Shapiro, *Intra-arterial cisplatin plus oral etoposide for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase II study.* J Neurooncol, 2001. **51**(1): p. 67-86.

36. Fortin, D., et al., *Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience.* Cancer, 2005. **103**(12): p. 2606-15.

37. Doolittle, N.D., et al., *Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors.* Cancer, 2000. **88**(3): p. 637-47.

38. Newton, H.B., et al., *Intra-arterial carboplatin and intravenous etoposide for the treatment of metastatic brain tumors.* J Neurooncol, 2003. **61**(1): p. 35-44.

39. Neuwelt, E.A., et al., *Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on methotrexate pharmacokinetics in the dog.* Neurosurgery, 1980. **7**(1): p. 36-43.

40. Hirano, Y., et al., *Therapeutic results of intra-arterial chemotherapy in patients with malignant glioma.* Int J Oncol, 1998. **13**(3): p. 537-42.

41. Neuwelt, E.A., et al., *Pharmacology and neurotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum, bleomycin, 5-fluorouracil, and cyclophosphamide administration following osmotic blood-brain barrier modification.* Cancer Res, 1983. **43**(11): p. 5278-85.

42. Friedman, H.S., et al., *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4733-40.

43. Kreisl, T.N., et al., *Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(5): p. 740-5.

44. Burkhardt, J.K., et al., *Intra-arterial delivery of bevacizumab after blood-brain barrier disruption for the treatment of recurrent glioblastoma: progression-free survival and overall survival.* World Neurosurg, 2012. **77**(1): p. 130-4.

45. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells.* Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 69-82.

46. Kraemer, D.F., et al., *Association of total dose intensity of chemotherapy in primary central nervous system lymphoma (human non-acquired immunodeficiency syndrome) and survival.* Neurosurgery, 2001. **48**(5): p. 1033-40; discussion 1040-1.

47. Bartus, R.T., et al., *Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7.* Exp Neurol, 1996. **142**(1): p. 14-28.

48. Ford, J., et al., *A phase I study of intravenous RMP-7 with carboplatin in patients with progression of malignant glioma.* Eur J Cancer, 1998. **34**(11): p. 1807-11.

49. Etame, A.B., et al., *Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology.* Neurosurg Focus, 2012. **32**(1): p. E3.

50. Bakay, L., et al., *Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier.* AMA Arch Neurol Psychiatry, 1956. **76**(5): p. 457-67.

51. Bakay, L., H.T. Ballantine, Jr., and E. Bell, *P32 uptake by normal and ultrasonically irradiated brain tissue from cerebrospinal fluid.* AMA Arch Neurol, 1959. **1**: p. 59-67.

52. Ballantine, H.T., Jr., E. Bell, and J. Manlapaz, *Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound.* J Neurosurg, 1960. **17**: p. 858-76.

53. Patrick, J.T., et al., *Ultrasound and the blood-brain barrier.* Adv Exp Med Biol, 1990. **267**: p. 369-81.

54. Clement, G.T. and K. Hynynen, *A non-invasive method for focusing ultrasound through the human skull.* Phys Med Biol, 2002. **47**(8): p. 1219-36.

55. Hynynen, K. and F.A. Jolesz, *Demonstration of potential noninvasive ultrasound brain therapy through an intact skull.* Ultrasound Med Biol, 1998. **24**(2): p. 275-83.

56. Hynynen, K. and G. Clement, *Clinical applications of focused ultrasound-the brain.* Int J Hyperthermia, 2007. **23**(2): p. 193-202.

57. Sheikov, N., et al., *Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles.* Ultrasound Med Biol, 2004. **30**(7): p. 979-89.

58. Hynynen, K., et al., *Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications.* Neuroimage, 2005. **24**(1): p. 12-20.

59. Sheikov, N., et al., *Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium.* Ultrasound Med Biol, 2008. **34**(7): p. 1093-104.

60. Sheikov, N., et al., *Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier.* Ultrasound Med Biol, 2006. **32**(9): p. 1399-409.

61. Treat, L.H., et al., *Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound.* Int J Cancer, 2007. **121**(4): p. 901-7.

62. Mei, J., et al., *Experimental study on targeted methotrexate delivery to the rabbit brain via magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound.* J Ultrasound Med, 2009. **28**(7): p. 871-80.

63. Liu, H.L., et al., *Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment.* Radiology, 2010. **255**(2): p. 415-25.

64. Hynynen, K., et al., *Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits.* Radiology, 2001. **220**(3): p. 640-6.

65. Hynynen, K., et al., *Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound.* Acta Neurochir Suppl, 2003. **86**: p. 555-8.

66. Kinoshita, M., et al., *Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1085-90.

67. Kinoshita, M., et al., *Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11719-23.

68. Treat, L.H., et al., *Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma.* Ultrasound Med Biol, 2012. **38**(10): p. 1716-25.

69. Liu, H.L., et al., *Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15205-10.

70. McDannold, N., et al., *MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain.* Magn Reson Med, 2004. **51**(5): p. 913-23.

71. Ng, K.Y., et al., *Effect of heat preconditioning on the uptake and permeability of R123 in brain microvessel endothelial cells during mild heat treatment.* J Pharm Sci, 2004. **93**(4): p. 896-907.

72. Vykhodtseva, N.I., K. Hynynen, and C. Damianou, *Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain in vivo.* Ultrasound Med Biol, 1995. **21**(7): p. 969-79.

73. Reinhard, M., et al., *Blood-brain barrier disruption by low-frequency ultrasound.* Stroke, 2006. **37**(6): p. 1546-8.

74. Hynynen, K., et al., *500-element ultrasound phased array system for noninvasive focal surgery of the brain: a preliminary rabbit study with ex vivo human skulls.* Magn Reson Med, 2004. **52**(1): p. 100-7.

75. Hynynen, K., et al., *Focal disruption of the blood-brain barrier due to 260-kHz ultrasound bursts: a method for molecular imaging and targeted drug delivery.* J Neurosurg, 2006. **105**(3): p. 445-54.

76. Crum, L.A., et al., *Acoustic cavitation produced by microsecond pulses of ultrasound: a discussion of some selected results.* J Acoust Soc Am, 1992. **91**(2): p. 1113-9.

77. Ting, C.Y., et al., *Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment.* Biomaterials, 2012. **33**(2): p. 704-12.

78. Raymond, S.B., et al., *Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo.* J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(2): p. 393-403.

79. Lo, E.H., et al., *Blood-brain barrier disruption in experimental focal ischemia: comparison between in vivo MRI and immunocytochemistry.* Magn Reson Imaging, 1994. **12**(3): p. 403-11.

80. Yang, F.Y., et al., *Evaluation of the increase in permeability of the blood-brain barrier during tumor progression after pulsed focused ultrasound.* Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 723-30.

81. Brem, H., et al., *Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas.* J Neurosurg, 1991. **74**(3): p. 441-6.

82. Walter, K.A., et al., *Interstitial taxol delivered from a biodegradable polymer implant against experimental malignant glioma.* Cancer Res, 1994. **54**(8): p. 2207-12.

83. Menei, P., et al., *Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma - A pilot study.* Cancer, 1999. **86**(2): p. 325-330.

84. Kubo, O., et al., *Local Chemotherapy with Slowly-Releasing Anticancer Drug Polymers for Malignant Brain-Tumors.* Journal of Controlled Release, 1994. **32**(1): p. 1-8.

85. DiMeco, F., et al., *Local delivery of mitoxantrone for the treatment of malignant brain tumors in rats.* J Neurosurg, 2002. **97**(5): p. 1173-1178.

86. Vogelbaum, M.A., *Convection enhanced delivery for the treatment of malignant gliomas: symposium review.* J Neurooncol, 2005. **73**(1): p. 57-69.

87. Chen, M.Y., et al., *Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time.* J Neurosurg, 1999. **90**(2): p. 315-20.

88. Lidar, Z., et al., *Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study.* J Neurosurg, 2004. **100**(3): p. 472-9.

89. Saito, R., et al., *Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model.* Neuro Oncol, 2006. **8**(3): p. 205-14.

90. Hadaczek, P., et al., *Convection-enhanced delivery of adeno-associated virus type 2 (AAV2) into the striatum and transport of AAV2 within monkey brain.* Hum Gene Ther, 2006. **17**(3): p. 291-302.

91. Laske, D.W., R.J. Youle, and E.H. Oldfield, *Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors.* Nature Medicine, 1997. **3**(12): p. 1362-8.

92. Vogelbaum, M.A., *Convection enhanced delivery for treating brain tumors and selected neurological disorders: symposium review.* J Neurooncol, 2007. **83**(1): p. 97-109.

93. Vogelbaum, M.A., et al., *Convection-enhanced delivery of cintredekin besudotox (interleukin-13-PE38QQR) followed by radiation therapy with and without temozolomide in newly diagnosed malignant gliomas: phase 1 study of final safety results.* Neurosurgery, 2007. **61**(5): p. 1031-7; discussion 1037-8.

94. Weber, F., et al., *Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma.* J Neurooncol, 2003. **64**(1-2): p. 125-37.

95. Sampson, J.H., et al., *Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors.* J Neurooncol, 2003. **65**(1): p. 27-35.

96. Kim, B.Y., J.T. Rutka, and W.C. Chan, *Nanomedicine.* N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2434-43.

97. Brown, S.D., et al., *Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(13): p. 4678-84.

98. Etame, A.B., et al., *Enhanced delivery of gold nanoparticles with therapeutic potential into the brain using MRI-guided focused ultrasound.* Nanomedicine, 2012. **8**(7): p. 1133-42.

99. Liu, H.L., et al., *Enhanced therapeutic agent delivery through magnetic resonance imaging-monitored focused ultrasound blood-brain barrier disruption for brain tumor treatment: an overview of the current preclinical status.* Neurosurg Focus, 2012. **32**(1): p. E4.

100. Neuwelt, E.A., et al., *Increased delivery of tumor-specific monoclonal antibodies to brain after osmotic blood-brain barrier modification in patients with melanoma metastatic to the central nervous system.* Neurosurgery, 1987. **20**(6): p. 885-95.

101. Immonen, A., et al., *AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study.* Mol Ther, 2004. **10**(5): p. 967-72.

102. Chen, M.Y., et al., *Surface properties, more than size, limiting convective distribution of virus-sized particles and viruses in the central nervous system.* J Neurosurg, 2005. **103**(2): p. 311-9.

103. Oshiro, E.M., et al., *Toxicity studies and distribution dynamics of retroviral vectors following intrathecal administration of retroviral vector-producer cells.* Cancer Gene Ther, 1995. **2**(2): p. 87-95.

104. Endoh, M., et al., *Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound.* Mol Ther, 2002. **5**(5 Pt 1): p. 501-8.

105. Shimamura, M., et al., *Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound.* Gene Ther, 2004. **11**(20): p. 1532-9.

106. Chen, Z.Y., K. Liang, and R.X. Qiu, *Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis.* J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 152.