



Luis Miguel Lopes Martinho

Novos sistemas para penetração da barreira hematoencefálica: das microbolhas à focagem de ultrassons

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica
sob orientação científica do Doutor Luis Fernando Morgado Pereira Almeida apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

NOVOS SISTEMAS PARA PENETRAÇÃO DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA: DAS MICROBOLHAS À FOCAGEM DE
ULTRASSONS

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Orientador: Doutor Luis Fernando Morgado Pereira Almeida

Contactos:

Luís Miguel Lopes Martinho

Urbanização Quinta da Bandeira N°31 Bloco F 2° Direito

5400-314 Chaves (Portugal)

E-mail: luis.miguel.martinho@hotmail.com

Índice

Índice de Tabelas	VI
Agradecimentos	VII
Abreviaturas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
1. Introdução	I
1.1. O cérebro.....	I
1.2. A Barreira Hematoencefálica (BHE).....	2
1.3. Os tumores cerebrais.....	5
2. Sistemas para penetração da BHE	9
2.1. Sistemas convencionais não específicos para permeabilizar a BHE.....	9
2.2. Técnica de Focagem de Ultrassons (FU).....	10
2.2.1. Princípio da FU.....	10
2.2.2. Estrutura da Técnica de FU.....	13
2.2.3. As microbolhas como agente de contraste.....	14
2.2.4. Aplicações terapêuticas das microbolhas.....	15
2.2.5. Potenciais mecanismos de ação da Técnica de FU.....	18
2.2.6. Os efeitos biológicos provocados pela Técnica de FU e pelas microbolhas.....	19
3. Aplicações da Técnica de FU	23
3.1. Entrega de anticorpos no cérebro.....	23
3.2. Entrega de quimioterapia convencional no cérebro.....	24
3.3. Entrega de nanopartículas terapêuticas no cérebro.....	25
3.4. Terapia Génica em tumores cerebrais.....	26
4. Patentes da Técnica de FU com aplicações a nível cerebral	29
5. Ensaio Clínico com a aplicação da Técnica de FU em doenças cerebrais	31
6. Empresas produtoras de dispositivos de FU	33
7. Discussão e Conclusão	35
Referências	i

Índice de Imagens

Figura 1. Estrutura da BHE e junção apertada.....	4
Figura 2. Aplicação da técnica de FU, permitindo a abertura da BHE.....	11
Figura 3. MRI para controlar a abertura da BHE, após a aplicação da Técnica de FU.....	12
Figura 4. Esquema representativo da técnica de FU associada a microbolhas na permeabilização da BHE.....	14
Figura 5. Mecanismos físicos subjacentes aos efeitos biológicos induzidos quando microbolhas são excitados por energia de ultrassom.....	16
Figura 6. Aplicação de microbolhas combinadas com a Técnica de FU para a entrega de agentes terapêuticos em tumores cerebrais.....	17
Figura 7. Histologia após a aplicação da Técnica de FU para a abertura da BHE.....	20

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação histológica de tumores cerebrais primários.....	6
Tabela 2. Classificação da Organização Mundial de Saúde de tumores do sistema nervoso central...	7
Tabela 3. Estratégias otimizadas que permitem a permeabilização da BHE.....	9
Tabela 4. Especificações das microbolhas comercializadas pelas diferentes empresas	15
Tabela 5. Patentes relacionadas com a Técnica de FU com aplicações cerebrais.....	26
Tabela 6. Ensaios Clínicos em curso com a aplicação da Técnica de FU a nível cerebral	27
Tabela 7. Empresas que produzem dispositivos que utilizam a técnica de focagem de ultrassom com fins terapêuticos e de investigação.....	28

Agradecimentos

A realização deste mestrado contribuiu de uma forma muito marcante para o meu desenvolvimento científico e pessoal, ajudando me a tornar uma pessoa diferente, mais responsável. Muitas pessoas estiveram presentes e de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, numa fase de muito trabalho na minha vida.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus colegas de mestrado por tudo que aprendi com eles, todos os jantares, todas as brincadeiras e apoio que me deram nestes dois anos. Foram e serão pessoas fantásticas na minha vida, na qual quero manter contacto por marcarem os meus fins de semana. Nunca me vou esquecer de todos os trabalhos de grupo até a altas horas e do que aprendi com eles. Um obrigado em especial a: Sara, Helena, Marcelo, João, Joana, Inês, Jorge, Vânia e Tiago.

Agradeço a todos os funcionários e amigos do Laboratório Matos Beja, pelo apoio e preocupação demonstrada durante o desenvolvimento desta dissertação, todas as palavras de força e incentivo. Agradeço-lhes por serem uns colegas de trabalho fantásticos que apesar de momentos difíceis, me fazem rir e esquecer muitas das vezes dos problemas. Nunca me vou esquecer que foi com o vosso carinho diário que lutei por isto, e tentar ser sempre o melhor. Fizeram sempre sentir-me em casa e apoiado. Mais recentemente, a nova colega e grande amiga de trabalho, Daniela, que sabe bem o que me custou desenvolver esta dissertação, quero-lhe agradecer do fundo do meu coração, porque foi ela que me ajudou imenso, o seu apoio e estar sempre disposta a ajudar, e sim Daniela, eu sinto que essa ajuda é sempre de coração. Adoro-te muito, graças à tua grande orientação consegui levar isto para a frente.

Quero agradecer à Preciosa, Melanie e Emanuel, por todas as terças na qual me ia divertir, e vou continuar, a jogar Dr. Why, todo o apoio que me dão, e pela paciência que tem comigo. Todas as palavras de incentivo e sempre com preocupação de saber como estava a correr a minha dissertação. Um obrigado por me fazerem feliz.

Um grande obrigado às minhas amigas CABAÇAS, Ana Rita, Cátia, Ana Soares, Marta, Ana Dias, foram sempre únicas neste percurso, a vossa companhia sempre essencial, aqueles cafés tudo mesmo, são pessoas que me fazem muito feliz.

Agora quero agradecer ao meu colega de casa e melhor amigo há anos, Daniel. Posso dizer que é graças a ti que isto é e foi possível. Nunca me vou esquecer de tudo que fizeste por mim, todo o incentivo, toda a ajuda e orientação que me deste para a realização desta dissertação. Posso dizer que parte desta dissertação também é tua. Não desisti disto porque

tu me ajudas todos os dias, a tua companhia, todos os jantares, todos os desabafos que faço quando chego a casa. Aquela paciência que tens comigo e todo o apoio nos momentos difíceis. Nunca me esqueço de todos os bolinhos que levavas para casa para me animar, ou mesmo nos meus momentos de desespero aquela força que só tu me sabes dar. Tenho tanto para te dizer que ia precisar de muitas mais folhas, mas tu sabes o quanto foste importante em toda a minha vida académica. Terás sempre um lugar especial na minha vida.

Agradeço também a um grande amigo, por todo o apoio e ajuda que me deu, tornou possível eu terminar esta dissertação. Obrigado por tudo, tu sabes.

À família, primos, tios e Avós, sem vocês nada disto era possível, um grande obrigado por tudo. À minha madrinha Lú, apesar de estar longe não me esqueço do que faz por mim e por toda a ajuda que me deu sempre. Nunca me esqueço do meu tio Armando me perguntar sempre como corria o meu mestrado, do meu tio e Padrinho me perguntar tanto pelo trabalho como pelo mestrado e pela sua grande ajuda informática que me dá e da minha tia Cristina me ajudar com o Inglês. À minha prima Cláudia que apesar de estar longe, está sempre muito perto, sempre me perguntou se precisava de ajuda e sempre com uma palavra amiga e de força a dar. Agora aos meus grandes Avós, por todo o apoio desde sempre, por me criarem, por me fazerem crescer, por serem uma referência na minha vida, por me ajudarem a tornar quem eu sou hoje. Sou quem sou por vocês, e luto todos os dias por vocês, porque sei o enorme orgulho que tem em mim e nunca vos quero desiludir. Parte da força que tive nesta etapa foi graças ao amor que me dão desde sempre, por todos os Natais, por todos as Páscoas e todas as comidinhas boas da minha avó, como o seu famoso cabrito e pudim de abóbora. Obrigado Martinhos, amo-vos.

Aos meus pais, que sempre me ajudaram nesta etapa, em tudo mesmo, sei que fazem tudo por mim e dão o que têm e o que não têm por mim. Apoiaram me sempre nas minhas escolhas e decisões e sei que os encho de orgulho todos os dias e vou continuar a fazê-lo, porque essa é a melhor recompensa que vos posso dar. Dedico aqui, esta dissertação à minha mãe, porque apesar de todos me apoiarem na decisão de frequentar o Mestrado, foi a ÚNICA que me apoiou a 100% nesta decisão e eu nunca na minha vida me vou esquecer disso. Foi contra a opinião de todos por mim, e isto só foi possível graças a ela, ficará para sempre gravado na minha memória. São os melhores pais do mundo, obrigado por me fazerem feliz.

Agora ao meu irmão Diogo, que é por ele que luto e é nele que eu penso quando me apetece desistir de tudo. Mano, és sempre a base do meu pensamento, a minha força interior, a minha vida. Sem ti não seria possível eu terminar esta etapa, porque todo o amor

e carinho que me dá faz de mim tentar ser o melhor para que nunca te falte nada. Tento sempre ser um exemplo a seguir e que aprendas a lutar pelos teus sonhos. Diogo, obrigado por seres o melhor irmão de sempre, Amo-te, tudo isto é por ti.

Por fim, agradeço ao meu orientador, Luis Almeida, por se ter disponibilizado para me orientar e me atribuir um tema interessante que me ajudou a enriquecer os meus conhecimentos. Além disso agradeço-lhe toda a paciência e ajuda preciosa dada por ele. Um grande obrigado professor nunca me vou esquecer o que fez por mim.

Abreviaturas

AuNPs – Nanopartículas de ouro

BBB – Blood-brain barrier

BCNU - Carmustina

BHE – Barreira hematoencefálica

CNS - Central nervous system

EC – Células endoteliais

JA – Junções apertadas

JEA – Junções endoteliais aderentes

MNPs – Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

MRI- Ressonância magnética

NGL - Núcleo geniculado lateral

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNC – Sistema nervoso central

FU – Focagem de ultrassons / Focused Ultrasound

ZO – Zónula de oclusão

Resumo

O cérebro é um órgão bastante complexo nos diversos seres humanos e organismos existentes, na qual a sua estrutura ainda permanece largamente desconhecida, sendo um dos grandes objetivos mais desafiadores de esclarecer. Na sua composição existem diversos componentes como neurónios, células glia, vasos sanguíneos que formam redes neurovasculares extremamente complexas sendo fundamental para as funções neurais avançadas. Para o proteger e manter a homeostase cerebral existe um sistema biológico altamente seletivo denominado de barreira hematoencefálica (BHE). Na composição da BHE existem quatro elementos celulares fundamentais: células endoteliais, astrócitos, pericitos e células da microglia permitindo assim que esta possua uma série de características fundamentais como a sua impermeabilidade e seletividade. A sua disfunção provoca uma alteração da homeostasia cerebral podendo levar a progressão de várias doenças do Sistema Nervoso Central (SNC).

Os tumores cerebrais afetam cada vez mais a população em todo mundo a cada ano, sendo um dos principais problemas de saúde pública podendo ter efeitos letais. Atualmente um dos grandes objetivos é provocar a abertura da BHE para que se seja possível tratar este tipo de tumores evitando recorrer à cirurgia e eventualmente a tratamentos pouco específicos. Inicialmente eram utilizados sistemas convencionais não específicos para permeabilizar a BHE, mas estes tinham uma limitação, a falta de alvos específicos na BHE. Assim com o aparecimento da Técnica de Focagem de Ultrassons (FU) juntamente com as microbolhas, é possível provocar a abertura da BHE cerca de 4-6 horas, de uma forma não invasiva e reversível com a aplicação transcraniana de ondas de ultrassom de baixa frequência, resultando assim numa entrega mais eficiente de agentes terapêuticos nas diferentes regiões cerebrais.

A FU permite realizar a entrega cerebral de anticorpos, agentes quimioterápicos, nanopartículas e genes específicos, que permite tratar doenças neurodegenerativas e essencialmente diferentes tumores cerebrais, na qual representa uma grande promessa no futuro.

Abstract

The brain is a very complex organ in the human being and other organisms, in which the structure remains largely unknown, and still is one of the great goals and more challenging to clarify. Regarding composition, there are several components such as neurons, glia cells, blood vessels that form extremely complex neurovascular network which is central to the advanced neural functions. To protect and maintain brain homeostasis there is a highly selective biological system called blood-brain barrier (BBB). The composition of the BBB are four fundamental cellular elements: endothelial cells, astrocytes, pericytes and microglial cells thus allowing this has a number of key features as its waterproof and its selectivity. Its dysfunction causes a change of brain homeostasis and can lead to the progression of various diseases of the central nervous system (CNS).

Brain tumors affect more and more people worldwide each year, becoming one of the main public health problems that can have lethal effects. Currently one of the major goals is to induce the opening of the BBB so that it is possible to treat such tumors avoiding resorting to surgery and eventually some specific treatments. Initially, nonspecific conventional systems to permeabilize the BBB were used, but these had a limitation, the lack of specific targets in the BBB. Thus with the onset of Focused Ultrasound Technique (FU) with the microbubbles, it is possible to cause the opening of the BBB for about 4-6 hours, in a non invasive and reversible manner with the transcranial applying of low frequency ultrasound, thus resulting in a more efficient delivery of therapeutic agents in different brain regions.

FU allows brain delivery of antibodies, chemotherapeutic agents, nanoparticles and specific genes which allow treating neurodegenerative diseases and brain tumors primarily different, which holds great promise for the future.

I. Introdução

I.1. O cérebro

O cérebro é o órgão mais sofisticado, complexo e significativo nos seres humanos e de outros organismos. O cérebro é um local de ação e cognição, no entanto, a sua função é comprometida por doenças neurológicas e mentais. Até agora, a estrutura e as funções do cérebro de mamíferos, ainda permanecem largamente desconhecidas. Esclarecer e decodificar a estrutura e as funções do cérebro é um dos grandes objetivos de pesquisa mais desafiadoras desde o Projeto Genoma Humano, uma vez que caracterizar a sua estrutura com alta resolução é crucial para compreender as suas funções e disfunções^(1, 2).

O cérebro humano é composto por diversos componentes finos, contendo geralmente cerca de mil milhões de neurónios e um número ainda superior de células gliais, bem como os vasos sanguíneos que viajam através das células densamente acondicionadas para formarem redes neurovasculares extremamente complexas. Estes vasos sanguíneos fornecem aos neurónios e células gliais energia e nutrientes e ainda são responsáveis por eliminar resíduos cerebrais^(3, 4).

As funções cerebrais, incluindo a geração de pensamentos, emoções, percepções, ações e memórias, são controladas principalmente por grupos de neurónios interligados, chamados de redes neuronais, em vez de somente por neurónios individuais⁽⁵⁾. O cérebro tem dois tipos de circuitos neurais: circuitos locais, em que as neurites se encontram na mesma área do cérebro, e circuitos distantes, nas quais as neurites se projetam de forma transversal ao longo das diferentes áreas do cérebro. A cooperação entre estes dois tipos de circuitos é feita através de projeções *wire-like*, sendo fundamental para as funções neurais avançadas.^(6, 7)

Durante muitos anos, os estudos sobre as funções do cérebro humano foram associados aos domínios cognitivos específicos e a estruturas anatómicas cerebrais discretas⁽⁸⁾. As evidências de relações de comportamento do cérebro surgiram principalmente de estudos sobre as consequências de lesões sobre a perda de funções cognitivas específicas⁽⁹⁾. Mais recentemente, devido à ressonância magnética (MRI), a comunidade neurocientífica constatou que a maioria das funções são suportadas pela atividade coordenada entre regiões cerebrais distintas separadas, de modo que o cérebro funciona em redes^(9, 10).

1.2. A Barreira Hematoencefálica (BHE)

O conceito de barreira hematoencefálica (BHE) surgiu no final do século XIX, na Alemanha, através de estudos realizados pelo cientista Paul Ehrlich onde, após injeções de corantes em animais, tanto na circulação arterial como na venosa, todos os órgãos, exceto o cérebro e a medula espinhal, se coravam, levando à hipótese da existência de dois compartimentos⁽¹¹⁾. Em 1913, Edwin Goldmann (um dos estudantes de Ehrlich) notou o fenômeno oposto injetando um corante diretamente no fluido cérebro espinhal, de animais, o qual manchou todo o sistema nervoso central (SNC) e nenhum dos órgãos periféricos⁽¹²⁾. No entanto, somente nos anos 60 Reese e Karnovsky e Brightman e Reese repetiram as experiências de Ehrlich e Goldmann ao nível ultra estrutural, por meio da microscopia eletrônica, identificando os capilares do SNC e a célula endotelial como a localização da barreira hematoencefálica⁽¹¹⁾.

A BHE é um sistema biológico altamente seletivo que mantém a homeostase cerebral. Devido à sua elevada eficiência, impede que 99% de moléculas pequenas atualmente disponíveis (> 400 Da) e todos os fármacos com moléculas grandes a atravessem, dificultando o tratamento clínico de doenças neurológicas, bem como o desenvolvimento de novos medicamentos para as tratar⁽¹³⁾.

A BHE é um importante componente na comunicação entre o SNC e os tecidos periféricos, além disso funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o SNC e permite criar um ambiente único e estável para uma atividade neuronal ótima. A sua impermeabilidade é o resultado de uma série de características únicas, o que dificulta a penetração desta barreira. Esta propriedade é baseada na existência de uma permeabilidade muito restrita do endotélio, além da presença de enzimas que exercem atividade de degradação presentes no interior do endotélio de modo que, com exceção da água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e apenas determinadas moléculas lipossolúveis podem passar a BHE de forma íntegra⁽¹⁴⁾.

As moléculas hidrofílicas, que são essenciais para o metabolismo do cérebro, tais como iões, glicose, aminoácidos e componentes de ácidos nucleicos, atravessam a BHE através de canais especializados^(15, 16). O transporte de moléculas hidrofílicas, tais como peptídeos e proteínas que não têm um sistema de transporte específico é muito mais lento do que as moléculas lipofílicas, no entanto, as quantidades que atravessam a BHE podem ser suficientes para causar um efeito mediado por recetores nos neurónios^(15, 17, 18).

Além das funções de permeabilidade seletiva a BHE possui aspetos importantes como funções neuroimunes, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. A

BHE pode receber estímulos e, simultaneamente, responder com secreções tendo esta função um papel central na resposta neuroimune⁽¹⁷⁾.

Na composição estrutural da BHE encontram-se quatro elementos celulares principais:

- Células endoteliais: são as principais constituintes da estrutura da BHE, formando os capilares do cérebro e da medula espinhal, em associação com várias células perivasculares, tais como células de músculo liso, pericitos, células da microglia e astrócitos^(15, 19). Estas células endoteliais dos capilares no cérebro encontram-se ligadas entre si, pela presença das junções apertadas (JA) e junções endoteliais aderentes (JEA) que são os principais reguladores da permeabilidade celular⁽²⁰⁻²²⁾. As JA entre as células endoteliais agem como uma barreira física altamente seletiva que permite a entrada de nutrientes necessários, assim como, proteger o SNC de agentes patogénicos e pequenas moléculas potencialmente nocivas que circulam no sangue. As JA consistem em três proteínas integrais de membrana denominadas claudina, ocludina e moléculas de adesão junctional e um número de proteínas citoplasmáticas acessórias, incluindo a zónula de oclusão (ZO) ZO-1, ZO-2 e ZO-3. As JEA possuem proteínas de membrana chamadas caderinas, que se unem com a actina via proteínas intermediárias, denominadas cateninas (α, β, γ), para formar ligações intercelulares e interagir com as JA^(23, 24) (Figura 1).

- Astrócitos: são células gliais em forma de estrela cujos prolongamentos finais formam um rendilhado de lamelas que adere à superfície externa do endotélio da BHE e a membrana basal respetiva, podendo estas células serem superiores em cerca de dez vezes os neurónios⁽²⁵⁻²⁷⁾. Segundo alguns estudos clínicos realizados indicam que os astrócitos são células excitáveis e desempenham um papel importante no processamento de informações e modulação da atividade neuronal⁽²⁵⁾. Desempenham uma função importante na regulação do tónus vascular, neste sentido o papel dos astrócitos tem sido estudado na manutenção e sinalização das células endoteliais da microvasculatura cerebral na génese de diferentes doenças e na integridade da BHE⁽²⁸⁾ (Figura 1).
- Células da microglia: derivam de células mesenquimais leptomenigeais, que se transformam em microglia na sua entrada no cérebro. Os monócitos circulantes fornecem outra fonte importante da microglia no cérebro. Estudos realizados em roedores e humanos têm mostrado que estas células são derivadas da medula óssea e regularmente substituídos por células precursoras monocíticas, representadas, por macrófagos do tecido do cérebro⁽²⁹⁻³²⁾ (Figura 1).

- Pericitos: são células vasculares adjacentes aos capilares que compartilham uma membrana basal comum com as células endoteliais, e têm muitos processos citoplasmáticos. A sua linhagem e identidade ainda não se encontram totalmente caracterizados, apesar de estas células evidenciarem ser morfológicamente, bioquimicamente e fisiologicamente heterogêneas. O seu recrutamento e as suas interações ao longo da parede endotelial microvascular são essenciais para a formação, maturação e manutenção da estrutura e funções normais microvasculares. Em situações de hipoxia ou trauma cerebral, há uma migração de pericitos, que por sua vez, provocam um aumento da permeabilidade da BHE e uma desorganização dos filamentos de actina nas células endoteliais ⁽³³⁻³⁶⁾ (Figura 1)

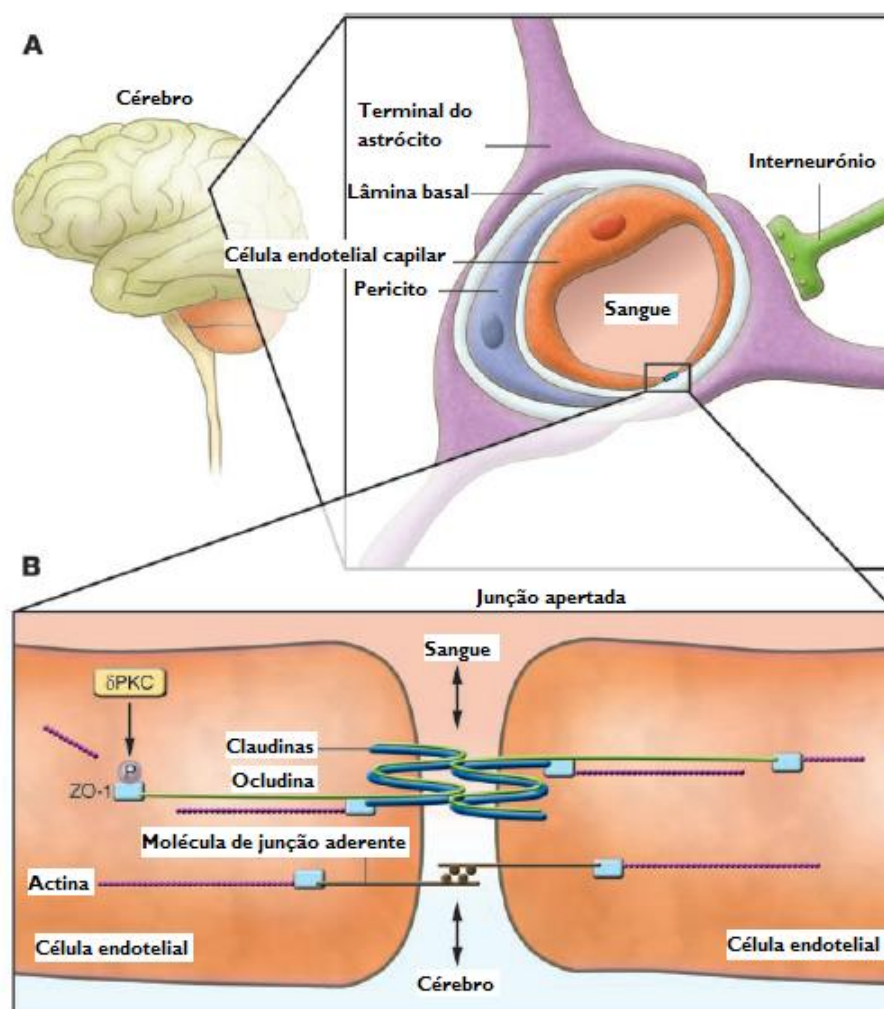


Figura 1. Estrutura da BHE e junção apertada. (A) A BHE é formada no sistema nervoso central por células endoteliais e elementos perivascularres (lâmina basal, pericitos, astrócitos, e interneurônios). (B) A junção apertada é estabelecida pela interação entre as proteínas transmembranares (claudinas, ocludina, e junção de moléculas de adesão) nas células endoteliais adjacentes. (Wen-Hai Chou et al., Messing, Hypertensive encephalopathy and the blood-brain barrier: is δ PKC a gatekeeper?, 2008)

A disfunção da BHE, muitas vezes chamado de “abertura da BHE”, tem sido descrita há muito tempo como um elemento-chave da progressão de várias doenças do SNC⁽³⁷⁻³⁹⁾. Possivelmente, este fenómeno ocorre devido à exposição do microambiente cerebral a substâncias potencialmente nocivas, podendo resultar numa perda da homeostase⁽⁴⁰⁾.

1.3. Os tumores cerebrais

Os tumores cerebrais malignos primários afetam cerca de 200.000 pessoas em todo o mundo a cada ano, podendo afetar qualquer pessoa em qualquer idade, com efeitos devastadores e letais. Assim, um dos principais problemas de saúde pública é causado por estes tumores⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Um tumor cerebral é uma neoplasia intracraniana que ocorre no cérebro ou o canal medular central. Ocorre devido a uma divisão celular anormal e descontrolada, habitualmente no cérebro, envolvendo neurónios ou células gliais (astrócitos que incluem, oligodendrócitos, células ependimárias) ou ocasionalmente no tecido linfático, vasos sanguíneos, nervos cranianos, meninges, crânio, glândula pituitária, ou glândula pineal, que é a principal causa de formação de tumores cerebrais primários. Os tumores primários do SNC refletem diferentes entidades patológicas e indicam uma maior heterogeneidade podendo ter uma evolução benigna, maligna ou imprevisível. Mas a maioria dos tumores cerebrais em adultos são tumores secundários ou metastáticos, ou seja, tumores que estão localizados principalmente em outros órgãos que se podem espalhar para o cérebro e criar tumores cerebrais⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

Existem diferentes tipos de tumores do SNC, em que cada um deles pode ser classificado em diversos tipos, incluindo tumores gliais e não neuroepiteliais. A primeira edição da classificação internacional de tumores do sistema nervoso humano foi preparada por Zólch e publicada em 1979, sendo esta classificação atualizada ao longo dos anos. Atualmente a classificação mais conhecido é a classificação dos tumores do SNC da Organização Mundial de Saúde (OMS), estando já na quarta edição, publicada em 2007 (Tabela I)⁽⁴⁷⁾.

Tumores do tecido Neuroepitelial				
Tumores astrocíticos	Tumores oligodendrogliais	Gliomas mistos	Tumores ependimários	Tumores do plexo-coroíde
Astrocitoma	Oligodendroglioma	Oligoastrocitoma	Ependimoma	Carcinoma do plexo-coroíde
Astrocitoma anaplásico	Oligodendroglioma anaplásico	Oligoastrocitoma anaplásico	Ependimoma anaplásico	Papiloma do plexo-coroíde
Glioblastoma multiforme			Ependimoma mixopapilar	
Astrocitoma pilocítico			Subependimoma	
Xantastrocitoma Pleomorfico				
Astrocitoma subependimal de células gigantes				
Tumores neurais e neurogliais	Tumores da parênquima pineal	Tumores embrionários	Tumores das meninges	
Gangliocitoma	Pineocitoma	Meduloblastoma	Meningioma	
Tumor neuroepitelial disembrionário	Pineoblastoma	Tumor neuroectodérmico primitivo	Hemangiopericitoma	
Ganglioglioma			Tumor melanocítico	
Ganglioglioma anaplásico			Hemangioblastoma	
Neurocitoma Central				

Tabela 1. Classificação histológica de tumores cerebrais primários. (Majid Kheirollahi et al., Brain tumors: Special characters for research and banking, 2015)

Além desta classificação dos tumores cerebrais pela OMS, esta entidade também os classifica segundo o seu grau, que varia de I a IV (Tabela 2). A junção do estado clínico, localização do tumor, alterações genéticas, e a extensão de ressecção cirúrgica que está associada com o grau do tumor, podem ser utilizadas para o prognóstico dos pacientes ^(46, 47).

Grau	Descrição
I	Crescimento lento do tumor, sobrevivência a longo prazo, oportunidade no pós-operatório de curar após a ressecção
II	Crescimento lento e às vezes tende a avançar para graus mais elevados de malignidade
III	Elevado potencial proliferativo, tumor maligno histologicamente, a maioria dos pacientes recebem radiação e / ou quimioterapia
IV	Rápida proliferação, tumor maligno citologicamente, muito agressivo

Tabela 2. Classificação da Organização Mundial de Saúde de tumores do sistema nervoso central.(Majid Kheirollahi et al., Brain tumors: Special characters for research and banking, 2015)

Existem sintomas básicos associados com o diagnóstico de um tumor cerebral em que o mais comum é a incapacidade neurológica, e numa condição avançada, progressiva diminuição funcional, declínio cognitivo e possivelmente levar à morte. Apesar dos progressos que têm sido feitos no tratamento e aumentos de tempos de sobrevida, continua a haver uma carga de sintomas substancial associada com o diagnóstico de um tumor cerebral. A fim de aliviar os sintomas, desacelerar o comprometimento neurológico e prolongar a vida, existem diferentes terapias como a radioterapia e quimioterapia, frequentemente com sintomas secundários graves que podem diminuir a qualidade de vida. Em casos extremos recorre-se à cirurgia para remoção total ou parcial do tumor ⁽⁴⁸⁾.

2. Sistemas para penetração da BHE

2.1. Sistemas convencionais não específicos para permeabilizar a BHE

Como a maioria dos agentes terapêuticos não atravessam facilmente a BHE, várias estratégias foram estudadas, que permitam, temporariamente, provocar a abertura ou permeabilizar a BHE, para que haja a passagem de alguns dos agentes terapêuticos (Tabela 3)⁽⁴⁹⁾.

Estratégia para permeabilizar a BHE
<ul style="list-style-type: none"> • Intra-arterial via carótidas • Intraventricular • Agentes osmóticos (Exemplo: Manitol) • Análogos (Bradicidina) • Entrega intersticial

Tabela 3. Estratégias otimizadas que permitem a permeabilização da BHE.(Arnold B. Etame et al., Focused ultrasound disruption of the blood brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neuro-oncology, 2012)

Uma estratégia que permite a permeabilização temporária da BHE pode ser alcançada utilizando um agente osmótico, tal como o manitol, o qual é entregue intra-arterialmente através das artérias carótidas, sendo que, a viabilidade desta abordagem tem sido demonstrada em tumores cerebrais⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Além disso, álcoois alquilados, tais como, o alquil-glicerol permitem permeabilizar a BHE de um modo semelhante, quando entregues intra-arterialmente⁽⁵²⁾.

À parte dos agentes osmóticos, existem mecanismos mediados por recetores que podem melhorar a permeabilidade da BHE. Um exemplo notável é o sistema em que análogos da bradicinina, tais como, o RMP-7 foram utilizados para uma maior permeabilidade da BHE^(53, 54). A aplicação pré-clínica de análogos da bradicinina com carboplatina intra-arterial parecia ser bastante promissora, devido à possibilidade de se verificar um aumento dos níveis dos agentes terapêuticos no cérebro⁽⁵⁵⁾. No entanto, quando uma estratégia semelhante foi aplicada nos ensaios clínicos de Fase II para tumores cerebrais em crianças, e gliomas recorrentes, os resultados dos ensaios clínicos não foram os esperados, uma vez que, não foi possível atingir concentrações terapêuticas razoáveis no interior do cérebro^(56, 57).

O aumento da permeabilidade da BHE, tanto pode ter efeitos benéficos como nocivos. Embora a BHE limite a entrega de agentes terapêuticos para o cérebro, também o protege

contra toxinas sistêmicas. As estratégias de permeabilização que aplicam agentes osmóticos, tais como manitol ou análogos da bradicinina podem resultar num aumento excessivo da permeabilidade da BHE com potencial para provocar efeitos irreversíveis⁽⁵⁸⁾.

A entrega intersticial envolve a injeção intravenosa ou a aplicação direta dos agentes terapêuticos no interior das cavidades do cérebro associadas a tumores removidos cirurgicamente, de forma a evitar a abertura da BHE^(59, 60). A administração de agentes de quimioterapia por infusão intersticial de alta concentração é realizada através da utilização de gradientes de pressão que permitem gerar um fluxo contínuo, o que irá levar à passagem dos agentes através da BHE para o cérebro. A distribuição destes agentes depende do seu peso molecular, da sua concentração e polaridade, assim como, do volume total e taxa de infusão⁽⁶¹⁾.

Uma das grandes limitações destes mecanismos é a falta de alvos específicos ao nível da BHE que permitam a sua permeabilização localizada para posterior entrega de agentes terapêuticos, além dos potenciais danos irreversíveis que podem ser causados à BHE⁽⁵⁸⁾.

2.2. Técnica de Focagem de Ultrassons (FU)

2.2.1. Princípio da FU

Um campo de ultrassons focalizado pode ser uma maneira não invasiva de aceder a locais do corpo que não estão acessíveis a técnicas convencionais e utilizado para induzir uma vasta gama de efeitos biológicos através de mecanismos térmicos ou mecânicos. A técnica de FU foi investigada desde 1940 para exploração não invasiva do cérebro, como uma potencial alternativa, de forma a evitar o recurso à cirurgia e à radiocirurgia⁽⁶²⁻⁶⁵⁾.

Até há pouco tempo, para testes clínicos com a utilização de ultrassons, era exigida uma craniotomia para permitir a propagação das ondas para o cérebro, uma vez que estas causavam um aquecimento do crânio, e uma alteração na direção das ondas provocando uma grande impedância acústica^(66, 67).

Na última década, têm sido desenvolvidos sistemas que permitem controlar o aquecimento do crânio causado pelos ultrassons, através do arrefecimento do couro cabeludo, com a utilização de um transdutor com uma maior área de abertura para distribuir a energia das ondas sobre uma maior região do crânio⁽⁶⁸⁾. Estes sistemas são combinados com a tomografia, que permite corrigir a amplitude das ondas e com a MRI que permite

monitorizar o aquecimento do crânio, estando a ser utilizados em ensaios clínicos de fase inicial em humanos⁽⁶⁹⁻⁷²⁾.

A grande vantagem e avanço da técnica de FU que a distingue relativamente às outras estratégias convencionais que permitem provocar a abertura da BHE é a sua capacidade seletiva. Ou seja, possibilita a sua abertura em determinadas regiões específicas da BHE, que resultam numa maior entrega local dos diversos agentes terapêuticos dentro do cérebro^(61, 73-76).

Além disso a técnica de FU possui outras vantagens, provocando a abertura da BHE: permite a entrega de diferentes agentes terapêuticos a nível cerebral, ser uma técnica transcraniana não invasiva, ser reversível permitindo que a BHE permaneça permeável durante um determinado período de tempo sem causar lesões, ser altamente dirigida e específica diminuindo possíveis problemas ao nível da BHE e melhorando a entrega de agentes terapêuticos⁽⁵⁸⁾.

A técnica de FU envolve a aplicação transcraniana de ondas de ultrassom de baixa frequência, que acabam por resultar no aumento da permeabilidade da BHE, levando conseqüentemente à sua abertura (Figura 2)^(77, 78).

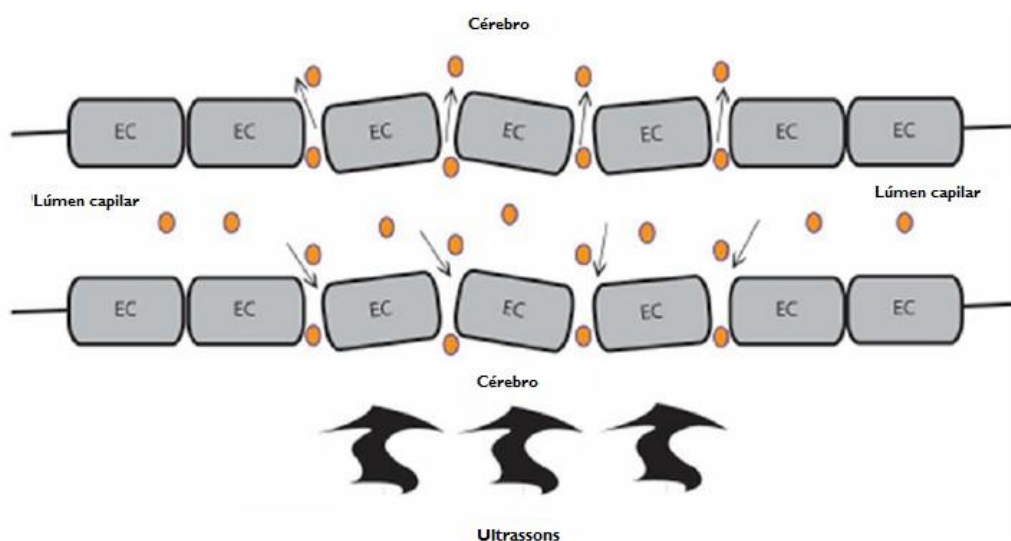


Figura 2. Aplicação da técnica de FU, permitindo a abertura da BHE. A técnica de FU proporciona ondas de ultrassom de baixa frequência que causam oscilações mecânicas nas microbolhas resultando na ruptura das junções apertadas que ligam as células endoteliais (EC), proporcionando um aumento da permeabilidade da BHE permitindo a entrada de agentes terapêuticos. (Arnold B. Etame et al., Focused ultrasound disruption of the blood brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neuro-oncology, 2012)

Convencionalmente são aplicadas ondas de ultrassom com uma frequência de cerca de 1Hz, com uma duração de 20 a 30 segundos, de forma repetida e contínua. Com aplicação de ondas de baixas frequências, a possibilidade de algum dano tecidual permanecer, nas células endoteliais da BHE, é bastante reduzida⁽⁷⁷⁾.

A técnica de FU deve ser aplicada em conjunto com a MRI, uma vez que através desta última será possível controlar e verificar se há abertura da BHE, bem como, visualizar o respectivo local onde foram aplicadas as ondas de ultrassom (Figura 3)⁽⁷⁵⁾.

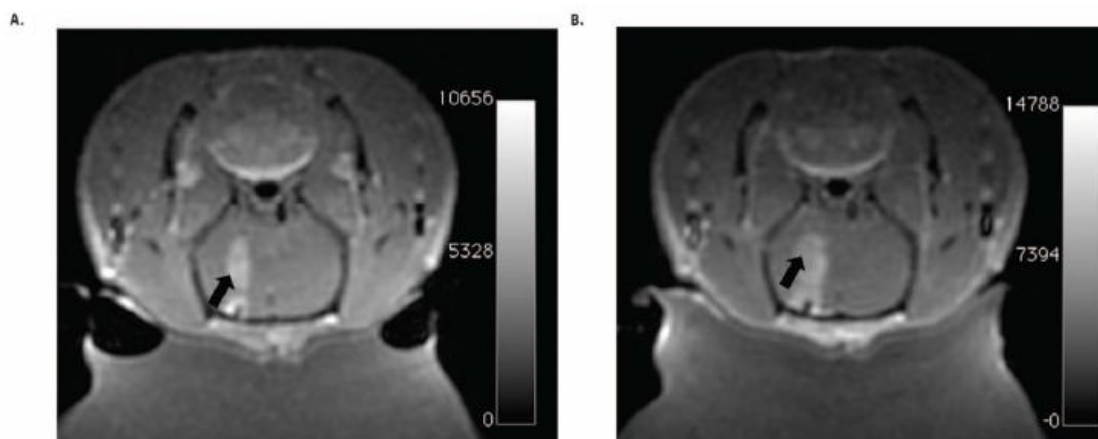


Figura 3. MRI para controlar a abertura da BHE, após a aplicação da Técnica de FU.(Arnold B. Etame et al., Focused ultrasound disruption of the blood brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neuro-oncology, 2012)

Os efeitos da técnica de FU podem ser melhorados através da sua combinação com as microbolhas, que estão comercialmente disponíveis como agentes de contraste para imagiologia de ultrassons. As microbolhas consistem em pequenas esferas que se encontram revestidas por lípidos ou albumina, com cerca de 1–10 μm de diâmetro, as quais possuem no seu interior um gás (perfluorocarbono)⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾.

A administração intravenosa de microbolhas permite reduzir a frequência de ondas necessária para provocar a permeabilização da membrana^(74, 76, 79). A viabilidade da utilização das microbolhas quando aplicadas com as ondas provenientes da técnica de FU foi demonstrada com sucesso há cerca de uma década atrás, na qual também se verificou que, a abertura da BHE não é tão evidente na ausência de microbolhas⁽⁷⁴⁾.

À medida que as microbolhas atravessam os capilares, podem expandir-se e comprimir-se com base na aplicação de ultrassons, sendo que, estes vão promover uma concentração superior de microbolhas em determinado local das paredes dos capilares, bem como, a

oscilação das microbolhas, o que por sua vez, irá provocar uma abertura mecânica das paredes dos capilares da BHE^(74, 77, 82). Além disso, as microbolhas emitem sinais acústicos que foram altamente relacionados com o aumento da permeabilidade da BHE, sem causar danos vasculares, sugerindo assim, que os sinais acústicos podem servir como um indicador de segurança da técnica^(79, 81).

A segurança da aplicação da técnica de FU para permeabilizar a BHE e permitir a sua abertura para a posterior aplicação de agentes terapêuticos está bem documentada. Os seus efeitos globais são temporários e reversíveis não provocando lesão neuronal evidente, dado que a permeabilidade da BHE dura no máximo aproximadamente 4 - 6 horas e permite a passagem de agentes com pesos moleculares até, pelo menos, 40 kDa^(73, 74, 76, 83).

2.2.2. Estrutura da Técnica de FU

O animal é anestesiado e colocado em decúbito dorsal com o couro cabeludo submerso numa câmara que contém água. Uma membrana permeável aos ultrassons é colocada entre o animal e a água, assim como um gel específico para ultrassons, que maximiza a transmissão dos ultrassons do transdutor de ondas para o animal. As ondas de ultrassons de baixa frequência (1Hz) são emitidas a partir de um transdutor focalizado e são transmitidas através da água até atingir o crânio. O eco acústico emitido pelas microbolhas durante a transdução das ondas de ultrassom é monitorizado por um recetor que transmite este tipo de sinal a um osciloscópio.

Antes da aplicação das ondas, são administradas aos animais, por via intravenosa, as microbolhas revestidas por lípidos ou albumina, assim como o agente terapêutico que se pretende que atinja o cérebro. De seguida, é seleccionada a área da BHE que se pretende permeabilizar, recorrendo à ajuda de uma técnica de MRI, sendo aplicadas posteriormente as ondas de ultrassom de baixa frequência da técnica de FU. Estas provocam aumento de concentração de microbolhas na zona seleccionada e a sua posterior oscilação, o que origina por fim a permeabilização da BHE. Os agentes terapêuticos são então distribuídos na zona pretendida do cérebro.

Além disso, antes e após a aplicação da técnica são obtidas imagens do cérebro do animal, através de MRI, para verificar e controlar as diferenças observadas na BHE (Fig.4)^(58, 80).

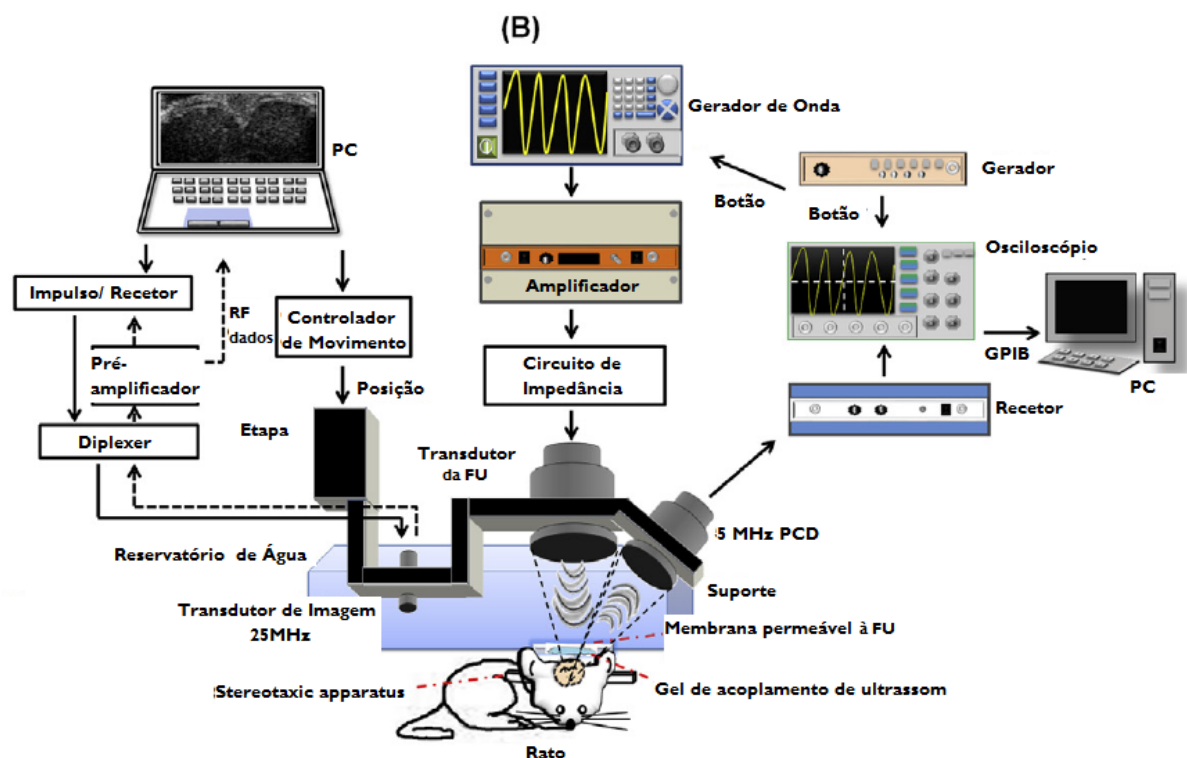


Figura 4. Esquema representativo da técnica de FU associada a microbolhas na permeabilização da BHE. (Ching-Hsiang Fan et al., Drug-loaded bubbles with matched focused ultrasound excitation for concurrent blood–brain barrier opening and brain-tumor drug delivery, 2015)

2.2.3. As microbolhas como agente de contraste

A primeira aplicação das microbolhas foi reportada em 1968 ao nível da ecocardiografia⁽⁸⁴⁾. Devido à ausência de estruturas que envolvessem as microbolhas, estas tinham uma semivida curta, de poucos segundos, o que limitava as suas aplicações clínicas. Atualmente existem novas estruturas de microbolhas que permitem a estas ter uma maior estabilidade, sendo conseguida através do aumento seu peso molecular, maior solubilidade, maior capacidade de difusão devido à incorporação de diferentes gases, tais como, azoto e perfluorocarbono e também pela utilização de um revestimento de um material biodegradável, como albumina, fosfolípidos e polímeros^(85, 86).

As microbolhas são altamente ecogénicas *in vivo*, devido à diferença de impedância acústica, entre os núcleos do gás e tecidos circundantes⁽⁸⁷⁾. Quando administradas por via intravenosa, são capazes de aumentar a intensidade das ondas de ultrassom até 20-30 dB,

podendo assim, servir como excelentes agentes de contraste para imagiologia de ultrassons⁽⁸⁸⁾.

Atualmente existem três empresas licenciadas, que comercializam microbolhas para aplicação em diagnóstico, sendo elas: a Optison™ (GE Healthcare, WI, USA), a Definity® (Lantheus Medical Imaging, MA, USA), e a SonoVue® (Bracco, Milano, Italy) (Tabela 4)⁽⁸⁹⁾.

Tipo de Microbolhas	Fabricante	Material da cápsula	Gás	Tamanho médio (µm)	Concentração (microbolhas/mL)	Semivida das microbolhas
Optison™	GE Healthcare	Albumina	C ₃ F ₈	2.0–4.5	5.0–8.0×10 ⁸	2.5–4.5
Definity®	Lantheus Medical Imaging	Fosfolípidos	C ₃ F ₈	1.1–3.3	1.2×10 ¹⁰	2–10
SonoVue®	Bracco	Fosfolípidos	SF ₆	2–8	0.9–6×10 ⁹	3–6
LipidMBs	Fabrico próprio	Fosfolípidos/lipo-polímero	C ₃ F ₈	0.2–0.7	1.4–3.0×10 ¹⁰	10-20
Microbolhas carregadas com BCNU	Fabrico próprio	Fosfolípidos	C ₃ F ₈	1.32 ±0.18	19.78 ±4.9×10 ⁹	10-20
Microbolhas carregadas com BCNU antiangiogénico	Fabrico próprio	Fosfolípidos	C ₃ F ₈	1.79 ±0.13	12.29 ±0.25×10 ⁹	10-20
Microbolhas carregadas com SPIO-DOX	Fabrico próprio	Fosfolípidos	C ₃ F ₈	1.04 ±0.01	3.25 ±0.30×10 ¹⁰	10-20

Tabela 4. Especificações das microbolhas comercializadas pelas diferentes empresas.(Hao-Li Liu et al., Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview, 2014)

2.2.4. Aplicações terapêuticas das microbolhas

Além da sua capacidade de aumento de contraste para aplicações de diagnóstico, as microbolhas também possuem propriedades únicas para aplicações terapêuticas⁽⁹⁰⁻⁹²⁾.

As microbolhas quando excitadas por ultrassons são capazes de interagir fisicamente com o ambiente que as rodeia através de cavitação estável ou por inércia. A cavitação

estável é gerada pela excitação das microbolhas através de ultrassons provocando contrações e expansões repetitivas das mesmas, que induzem um fluxo do líquido em torno das microbolhas (chamado *microstreaming*) que por sua vez, irá provocar *stress* nas membranas das células. Conseqüentemente, leva à formação de canais iônicos, afetando assim, a permeabilidade celular^(93, 94). Na cavitação inercial, a pressão excessiva de ultrassons irá provocar a destruição das microbolhas gerando ondas de choque muito poderosas que podem causar a perfusão das células e até mesmo dos vasos sanguíneos em redor, levando a uma hemorragia (Figura 5)^(95, 96).

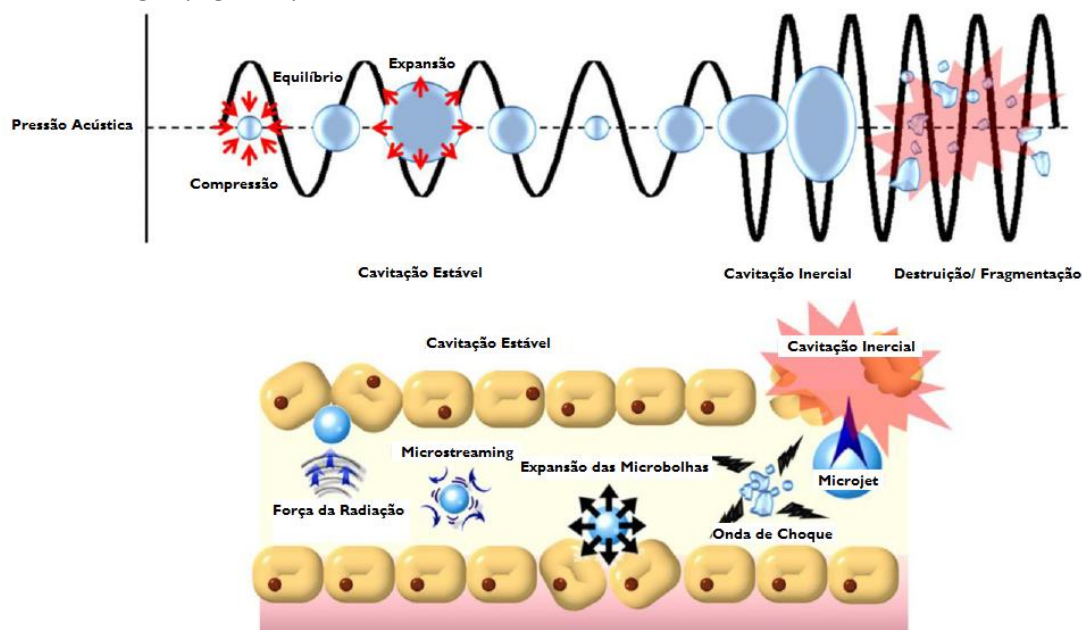


Figura 5. Mecanismos físicos subjacentes aos efeitos biológicos induzidos quando microbolhas são excitadas por energia de ultrassom.(Hao-Li Liu et al., Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview, 2014)

Recentemente, tem sido investigado o uso de microbolhas em conjunto com ultrassons para provocar a abertura da BHE, para que permita a entrega de agentes com aplicações terapêuticas. O tratamento com ultrassons, na presença de microbolhas, foi confirmado como sendo capaz de induzir a abertura da BHE devido ao rompimento de JA nos capilares do SNC. Os efeitos sinérgicos da FU juntamente com as microbolhas têm sido utilizados para aumentar a permeabilidade das barreiras biológicas, tais como membranas celulares, pequenos vasos sanguíneos, e BHE, podendo as microbolhas servir como transportadores de fármacos/agentes terapêuticos de proteção. Outra vantagem é que os agentes terapêuticos encapsulados podem ser libertados durante o processo de destruição das microbolhas quando aplicados os ultrassons. Assim, medicamentos quimioterapêuticos, podem ser direta e especificamente entregues aos tecidos-alvo através

da abertura mediada por FU, ao passo que a absorção dos medicamentos por tecidos não-alvo é reduzido, sendo um dos exemplos a aplicação em tumores cerebrais (Figura 6)⁽⁹⁶⁻⁹⁹⁾.

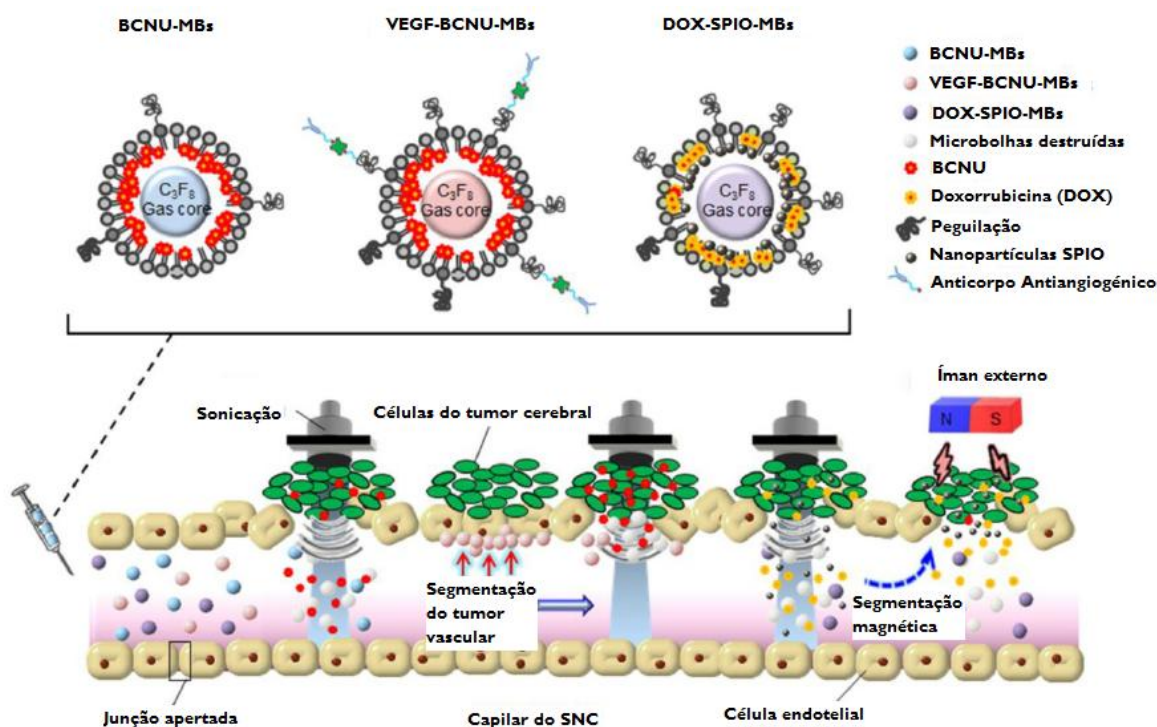


Figura 6. Aplicação de microbolhas combinadas com a Técnica de FU para a entrega de agentes terapêuticos em tumores cerebrais. As microbolhas já possuem à superfície os agentes terapêuticos que após atravessarem a BHE vão ser libertados a nível cerebral tendo com alvo principal as células do tumor cerebral(Hao-Li Liu et al., Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview, 2014)

Dado que as microbolhas atuam como agentes de contraste de ultrassom, o processo de entrega de agentes terapêuticos, pode também ser monitorizado através da detecção das microbolhas⁽⁸⁶⁾. Várias estratégias têm sido propostas para a incorporação de agentes terapêuticos nas microbolhas incluindo a sua fixação à superfície exterior, a incorporação no interior do invólucro, dissolvendo fármacos hidrofóbicos na camada oleosa de gás entre o núcleo e capsula que reveste a microbolha, e ligando-os, através de interações biotina-estreptavidina^(100, 101). Além disso, os agentes terapêuticos, podem ser pré-incorporados em transportadores, tais como lipossomas, micelas, ou microesferas, e estas estruturas podem então ser facilmente ligadas aos lípidos das microbolhas, geralmente através de interações avidina-biotina⁽¹⁰²⁾. Posteriormente, para que haja a libertação do agente terapêutico é necessário utilizar intensidades mais elevadas de ondas de ultrassom para que haja a sua libertação⁽¹⁰³⁾

2.2.5. Potenciais mecanismos de ação da Técnica de FU

A combinação da técnica de FU com o uso de microbolhas tem sido amplamente estudada e experimentada nos mais diversos cenários, de forma a poder provocar a abertura da BHE. Mas o facto é que o mecanismo exato de ação destas técnicas que promovem esta abertura da BHE ainda não é totalmente conhecido. Desde logo, dois dos principais efeitos conhecidos desta técnica combinada não serão os responsáveis por este efeito. Isto porque o aquecimento provocado pelas ondas emitidas não é considerado significativo para promover uma abertura por si só da BHE, sendo o aquecimento provocado medido usando equipamentos de MRI em conjunto com a aplicação da técnica de FU⁽⁷⁴⁾. Além deste efeito, a cavitação inercial promovida pelas microbolhas não é a responsável só por si pela abertura da BHE, pois em estudos que fizeram a gravação das ondas acústicas emitidas a abertura da BHE foi observada com ondas acústicas que não são de larga amplitude, ao contrário das que são emitidas pelas microbolhas e que caracterizam as mesmas⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾.

Um dos mecanismos também excluído é designado por “*sonoporation*”, efeito este que é provocado pelas sonicação provocada pelas microbolhas e que promove a formação de poros transitórios nas células da BHE permitindo assim a entrada de agentes terapêuticos nas mesmas e no tecido cerebral⁽¹⁰⁷⁾. Mas este efeito é apenas transitório e rapidamente estes poros são resolvidos pelas células, ao contrário da abertura provocada pela FU e microbolhas que permite a entrada de agentes terapêuticos no tecido cerebral durante várias horas.

O que de facto acontece ainda não é sabido, ou seja, não se sabe se a utilização de FU/ microbolhas está a provocar alterações mecânicas e físicas na BHE ou se por sua vez esta está a despoletar uma resposta fisiológica que vai induzir uma abertura temporária da BHE. Relacionado com estes mecanismos, já foram encontradas evidências de forças diretas que afastam mecanicamente as JA e promovem o transporte ativo através das mesmas, efeito observado com recurso à microscopia eletrónica^(83, 108).

Uma vez que não podemos considerar o aquecimento de massa e a cavitação inercial, resta assim ter em conta os efeitos oscilatórios das microbolhas dentro do campo das ondas ultrassónicas. São vários os efeitos produzidos por estes movimentos que têm potencial para provocar a abertura da BHE. As microbolhas tendem a dirigir-se na direção da propagação das ondas e devido a isto estas vão entrar em contacto direto com o endotélio vascular. Quando ocorre este contacto as microbolhas podem perder a sua cápsula protetora, podem ser divididas em microbolhas mais pequenas ou podem ainda aumentar o seu tamanho devido a fenómenos de difusão⁽¹⁰⁹⁾. As microbolhas podem ser responsáveis ainda por

promover a formação de microcorrentes dentro dos vasos sanguíneos, o que por sua vez vai provocar *stress* nas paredes e células do endotélio vascular devido ao efeito de raspagem e desgaste que estas correntes provocam, funcionando como uma erosão das paredes vasculares. Outro efeito mais drástico destas correntes poderá ser o deslocamento das paredes dos vasos em direção ao tecido cerebral⁽¹¹⁰⁾.

Desta forma, é fácil perceber que o comportamento das microbolhas num campo acústico complexo, como é o dos vasos sanguíneos que fazem parte da BHE é também ele complexo, podendo mesmo ser diferente num meio ambiente como este quando comparado a um meio onde o líquido flui livremente⁽¹¹¹⁾.

2.2.6. Os efeitos biológicos provocados pela Técnica de FU e pelas microbolhas

A abertura da BHE pode ocorrer quase imediatamente à aplicação da Técnica de FU, ocorrendo uma diminuição gradual da sua abertura ao longo de várias horas^(61, 74, 112, 113). A concentração do agente terapêutico fornecido através da BHE parece ser muito maior na substância cinzenta do cérebro do que na substância branca, presumivelmente devido às diferenças na densidade vascular⁽¹¹⁴⁾. Vários estudos mostraram que a BHE parece ser amplamente restaurada em cerca de 4-6 horas após a aplicação de FU^(61, 74, 83, 113, 115, 116). Outras experiências indicam que ainda se verificam baixos níveis de abertura da BHE, 24h após a aplicação de FU⁽¹¹⁷⁾. A discrepância destes estudos ainda não é clara, mas os métodos de deteção mais sensíveis, tais como MRI de alto campo combinado com grandes doses de agente de contraste são capazes de detetar baixos níveis de abertura da BHE⁽¹¹⁵⁾.

Este período em que a BHE se encontra parcialmente aberta, é ideal para a entrega de agentes terapêuticos, mesmo de longa duração na circulação, mas não tão longa que possa provocar toxicidade ou uma desagregação crónica das células endoteliais da BHE. Tal é comprovado através da microscopia de luz, em que o aspeto do cérebro se encontra normal, após a aplicação de FU, mesmo depois de sessões semanais repetidas^(114, 118).

Estudos histológicos têm demonstrado, que após a abertura e posterior reparação da BHE, a única característica observada é a formação de alguns aglomerados de glóbulos vermelhos, designados de petéquias (Figura 7), que se pensa serem formados durante a cavitação inercial^(75, 105, 119).

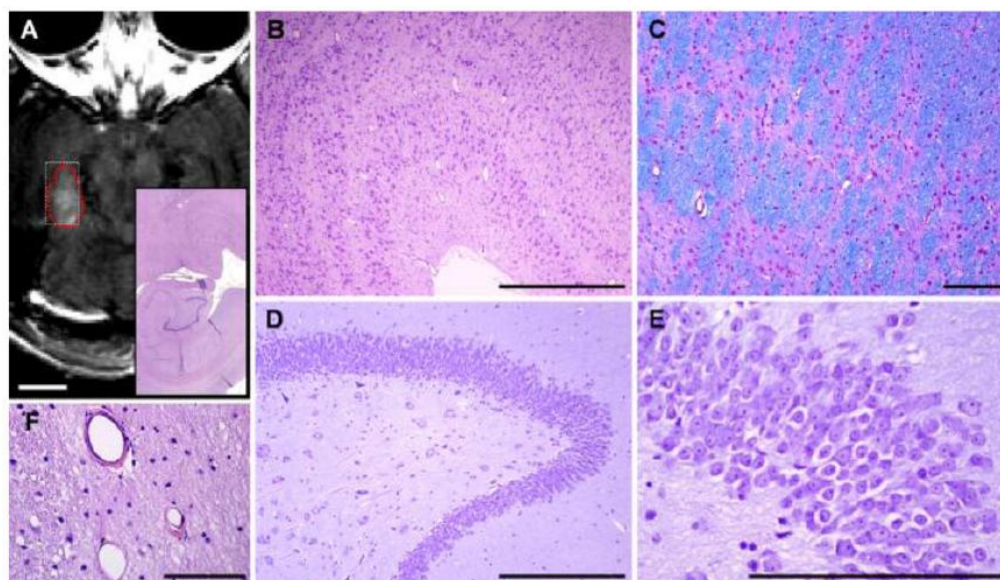


Figura 7. Histologia após a aplicação da Técnica de FU para a abertura da BHE.

Este exemplo foi obtido após sonicação volumétrica para induzir a abertura da BHE no hipocampo e no núcleo geniculado lateral (NGL) em macaco. **(A)** MRI mostrando a abertura da BHE provocado pela técnica de FU. **(B)** microfotografia de baixa ampliação, mostrando a histologia no hipocampo / NGL. **(C -D)** Grande ampliação que mostra camadas de aparência normal na LGN. **(E-F)** Alta ampliação do hipocampo mostrando a camada de células aglomeradas (petéquias). (Reprinted from Cancer Research 2012; 72:3652–3663; c 2012 American Association for Cancer Research)

Embora a presença destas petéquias seja indesejável, o seu impacto sobre o cérebro é mínimo. Algumas das investigações nesta área são dedicadas à pesquisa de danos vasculares graves que podem ocorrer após a aplicação de ultrassons. Assim sendo, dedicam-se à pesquisa de isquemia ou apoptose de neurónios, o que não se verifica, apenas se observam alguns danos individuais em neurónios^(75, 77). Mas nada invalida que, em níveis excessivos de exposição, danos vasculares mais graves, danos no parênquima e perda neuronal possam ocorrer^(74, 120).

Através da microscopia eletrônica de transmissão, foi demonstrado um aumento das vesículas citoplasmáticas no endotélio e pericitos (sugestivos de transcitose), formação de poros trans-endoteliais, abertura das JA, e transporte de componentes da circulação através da BHE⁽¹⁰⁸⁾. A partir da imunomarcção foi possível verificar, o desaparecimento das JA, ocludinas, claudinas-5, e ZO-1, durante 1-4 horas após a aplicação da FU⁽⁸³⁾. Após 6 e 24h, as JA foram restauradas o que por sua vez leva a que a BHE já não permaneça aberta.

Recentemente foi descrito que, em resposta à estimulação mecânica induzida pela técnica FU, haja a ativação intracelular de cascatas de sinalização. Verificando-se um aumento da fosforilação de Akt e GSK3 β em neurónios que se encontram mais próximos da BHE⁽¹²¹⁾. A

fosforilação de Akt tem sido associada à neuroprotecção após acidente vascular cerebral, enquanto que, a ativação das quinases p38 e JNK MAP promovem a apoptose neuronal⁽¹²²⁻¹²⁴⁾.

A sinalização de Ca^{2+} também tem sido sugerida como sendo estimulada pela FU quando provoca a abertura da BHE. Assim, verificam-se alterações imediatas na concentração de Ca^{2+} intracelular nas células em contacto direto com microbolhas, assim como nas células vizinhas⁽¹²⁵⁾.

3. Aplicações da Técnica de FU

3.1. Entrega de anticorpos no cérebro

Os anticorpos são uma forma eficaz e fiável de combater diversas doenças, potencialmente também as que atingem o tecido cerebral, tais como doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais⁽¹²⁶⁾.

A utilização de anticorpos para o tratamento de doenças neurodegenerativas nem sempre tem tido pouca expressão uma vez que há um número bastante reduzido de canais de transporte de água e reduzido número de mecanismos de transporte ativo no tecido do endotélio cerebral, o que não permite o transporte de anticorpos até ao local onde se pretende que estes atuem, sendo que previamente já existe uma grande dificuldade na passagem destes anticorpos através da BHE. Recentemente, a utilização da técnica de FU já demonstrou ser eficaz na entrega de anticorpos através da BHE num estudo em que anticorpos contra o recetor de dopamina atravessaram a BHE ocorrendo a sua posterior ligação ao antigénio específico⁽¹²⁶⁾.

De forma semelhante a esta já foi descrito que seria potencialmente promissor o uso de anticorpos em doenças neurodegenerativas, sendo um dos casos mais óbvia Doença de Alzheimer, onde ocorre uma acumulação de placas de peptídeo β -amilóide que provocam toxicidade local e déficencial. Já foi demonstrado em ratos que a entrega intracraniana direta de anticorpos contra estas placas acumuladas leva a uma redução das mesmas⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾. Mas mantém-se o problema da entrega dos anticorpos ser um método invasivo que pode gerar por si mesmo toxicidade devido à alta concentração de anticorpos utilizados. Assim, recentemente foi utilizada uma técnica de FU mediada por MRI onde os anticorpos foram introduzidos de forma intravascular e cujo alvo de ligação eram as placas β -amilóides. A experiência resultou num decréscimo significativo do tamanho das placas, para além de que os investigadores concluíram ainda que a dose de anticorpos a utilizar foi muito menor, obtendo-se resultados semelhantes aos observados quando os anticorpos são introduzidos intracranialmente em doses mais elevadas⁽¹³⁰⁾.

Uma das áreas com maior potencial para o uso da FU na entrega de anticorpos são os tumores cerebrais, pelas suas potencialidades no tratamento dirigido e altamente específico contra células tumorais. Anticorpos monoclonais que já são usados para o tratamento de tumores disseminados pelo organismo que poderiam ser aplicados para o tratamento de metástases e ainda tumores primários cerebrais⁽¹³¹⁾.

Por exemplo, a herceptina, que atua como um anticorpo monoclonal anti-HER2 e é um dos alvos terapêuticos para o tratamento do cancro da mama, já foi entregue através da BHE utilizando a técnica de FU mediada por MRI como forma de se conseguir provar o a entrega deste tipo de anticorpos através da BHE. Este estudo vem trazer esperança num futuro em que mais anticorpos possam ser usados em tumores cerebrais e numa possível extrapolação do uso destes anticorpos no tratamento não só de tumores mas também de outras patologias cerebrais, terapêutica esta que de outra forma seria muito dificilmente exequível⁽¹³¹⁾.

Portanto uma das aplicações mais vantajosas da técnica de FU, bem como uma das suas aplicações mais práticas é que esta permite promover a passagem de moléculas com tamanhos significativos, como são os anticorpos, através da BHE e permite que estes atuem no tecido cerebral de forma específica no tratamento das mais variadas patologias que estão ligadas a este tecido⁽⁵⁸⁾.

3.2. Entrega de quimioterapia convencional no cérebro

Uma vez que a BHE compromete significativamente a biodisponibilidade dos agentes quimioterápicos no cérebro, várias estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de contornar este problema. São diversas as abordagens que têm sido testadas e utilizadas e que têm como objetivo comum o aumento da concentração dos agentes quimioterápicos no cérebro. Uma delas é a utilização de matrizes biodegradáveis, que são carregadas com o agente quimioterápico e que são implantadas dentro do tumor⁽¹³²⁾. Outras abordagens incluem sistemas de entrega de quimioterapia convencionais melhoradas e a quimioterapia intra-arterial. No entanto, mesmo com estas abordagens mais sofisticadas e melhoradas, a biodisponibilidade dos agentes quimioterápicos continua reduzida, o que torna a sua eficácia abaixo do desejado. Contudo, alguns resultados pré-clínicos que têm vindo a ser obtidos parecem promissores, embora os benefícios nos ensaios clínicos tenham ainda sido mínimos⁽¹³³⁻¹³⁵⁾.

Foram já efetuados estudos pré-clínicos com a utilização de FU, com o objetivo de avaliar a viabilidade da entrega da quimioterapia em tumores cerebrais. Esta estratégia foi aplicada pela primeira vez com sucesso com a doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia de vários cancros, que praticamente não atravessa a BHE. Os investigadores demonstraram que hemisférios de ratos tratados com FU apresentam um

aumento significativo na concentração de doxorubicina, comparando com hemisférios de ratos não tratados com FU. Além disso, um estudo posterior demonstrou um substancial benefício terapêutico da entrega mediada por FU de doxorubicina encapsulada em lipossomas em ratos com gliomas intracranianos^(136, 137).

A entrega de metotrexato (citostático que inibe o crescimento celular e que também é utilizado em tratamentos de quimioterapia) no cérebro, usando FU para a abertura da BHE também tem sido estudada. Mei e colaboradores avaliaram a entrega intravenosa de metotrexato assistida por FU intracranial no cérebro de coelhos, comparando com a injeção intracarótida. Observaram uma entrega mais orientada e aumentada do metotrexato intravenoso até 10 vezes, quando utilizaram FU. Além disso, a estratégia de entrega com FU mostrou ser mais eficaz do que a entrega via injeção intracarótida⁽¹³⁸⁾.

Mais recentemente, Liu e colegas investigaram a entrega do quimioterápico, Carmustina BCNU, mediada por FU em estudos pré-clínicos em animais com tumores cerebrais. Relataram aumentos substanciais da biodisponibilidade de BCNU nos tumores de animais tratados com FU comparando com animais não tratados com FU. No mesmo sentido, a progressão do tumor foi significativamente diminuída, factos suportados pela evidente diminuição do tamanho dos tumores de animais tratados com FU. Estes investigadores ainda demonstraram um aumento significativo de sobrevivência associada à entrega de BCNU mediada por FU⁽¹³⁹⁾.

Os dados pré-clínicos e os resultados preliminares obtidos até agora sobre a entrega de agentes quimioterapêuticos no cérebro parecem muito promissores, demonstrando tanto viabilidade como eficácia. No entanto, aplicações pré-clínicas adicionais devem abrir caminho para os estudos clínicos^(58, 139).

3.3. Entrega de nanopartículas terapêuticas no cérebro

Os sistemas de transporte baseados em nanotecnologias geraram um grande interesse em aplicações que apresentam como alvo tumores, graças às características únicas que estes sistemas possuem. Estima-se que poderão conseguir contornar muitos dos obstáculos associados à quimioterapia convencional para tumores malignos cerebrais⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾.

No entanto, a BHE continua a ser uma limitação para este método baseado em nanotecnologia. Por exemplo, as nanopartículas de ouro (AuNPs), que ganharam um destaque em cancros sistémicos, apresentam ainda um entrave na sua biodistribuição a nível cerebral^(82, 140-144). Assim, estratégias como a técnica de FU, que são capazes de

umentar a permeabilidade da BHE para os transportadores das nanopartículas, poderão melhorar a aplicabilidade desta tecnologia em tumores cerebrais malignos⁽¹⁴⁴⁾.

Recentemente, foi testada a entrega mediada por ondas de FU de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs) conjugadas com um agente antineoplásico, a epirrubicina, sendo que esta conjugação facilita, de acordo com as características da MRI, a imagem obtida para posterior análise. Seguidamente, foi demonstrada uma acumulação de MNPs e de epirrubicina no cérebro 15 vezes mais intensa quando conjugadas com a aplicação de FU. Em alguns estudos realizados observou-se uma diminuição da progressão do tumor, em animais, que receberam metaloproteinases conjugadas com epirrubicina quando aplicada FU⁽¹⁴⁵⁾.

Na parênquima, observou-se uma melhoria no transporte das nanopartículas de ouro revestidas por polietilenoglicol em cérebros normais e na periferia de tumores cerebrais em modelos de rato é similar ao transporte intracraniano de nanopartículas magnéticas⁽⁵⁸⁾.

A combinação da técnica de FU com sistemas de entrega de nanopartículas criou novas perspectivas, em termos de alvos moleculares como forma de terapia, uma vez que, estes sistemas são fáceis de funcionalizar, com a ligação de inibidores de moléculas pequenas, proteínas, ácidos nucleicos e anticorpos na superfície da nanopartícula⁽⁵⁸⁾.

3.4. Terapia Génica em tumores cerebrais

Desde à muito tempo que a terapia génica vem a ser implementada no tratamento de tumores cerebrais, sendo que a maioria das terapias atualmente utilizadas requerem um vetor viral para fazer a entrega de genes ou inibidores de expressão genética. O grande problema que se coloca na utilização destas metodologias é a forma de entrega destes vetores na zona onde se localiza o tumor^(146, 147). As mais utilizadas são a injeção intratumoral, sistemas de entrega por convecção melhorada e ainda entrega intraventricular. Mas todas estas formas de entrega da terapia apresentam uma grande limitação, pois todas elas são invasivas. Para além deste facto, existe ainda uma outra contraindicação ao uso destas técnicas ligada ao facto de estas poderem provocar efeitos de toxicidade a nível cerebral, devido às altas doses que são utilizadas e entregues *in loco*⁽¹⁴⁸⁾.

Os métodos de entrega deste tipo de terapia por via intravascular também não se apresentam como solução ao problema, pois ficam desde logo limitados pela existência da BHE que vai limitar fortemente a passagem dos vetores e da respetiva terapia até ao local onde se localiza o tumor^(149, 150).

Assim, surge a técnica de FU e as suas potencialidades e vantagens na entrega e utilização da terapia génica. As primeiras experiências que combinaram aFUe a terapia génica foram realizadas com um vetor viral modificado a partir do vírus *Herpes Simplex*⁽¹⁵¹⁾. Com evidências de análises histológicas foi possível comprovar a entrega do vetor/terapia no hemisfério cerebral que foi sujeito à aplicação da FU, o que significa que esta técnica tem potencial para substituir as que se tentam utilizar hoje em dia, ou seja, as que são de distribuição viral intracelular⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾. No caso concreto dos gliomas, o que se pretende ao utilizar a terapia génica é combater células tumorais invasivas que tenham escapado às terapias convencionais e locais como sejam a cirurgia e a radioterapia, logo a utilização de FU seria o ideal visto permitir dirigir e focar a aplicação da terapia em causa a determinado local onde se encontrem as células malignas⁽¹⁵¹⁾.

Para além destas experiências iniciais com a técnica de FU, já foram demonstrados resultados animadores aumentando a expressão e entrega do gene produtor de luciferase no sistema nervoso central de ratos, aplicando a técnica de FU otimizada com o uso de microbolhas⁽¹⁵⁵⁾.

Esta tecnologia pode permitir a entrega de genes que complementem uma mutação ocorrida numa célula tumoral ou ainda permitir o silenciar de genes, como sejam os *microRNA* ou ainda os genes *RNA short hairpin*, o que permitiria controlar a sobre expressão de determinadas proteínas por parte das células tumorais. O uso deste tipo de método já foi alcançado e permitiu reduzir a expressão de survivina, proteína responsável pela resistência à apoptose apresentada pelas células tumorais e que é expressa por células de glioma maligno. Este feito foi alcançado utilizando um modelo de tumor cervical utilizando a técnica de FU para fazer a entrega de um vetor *RNA short hairpin*, silenciador do gene produtor da survivina⁽¹⁵⁶⁾.

Mais estudos e testes pré-clínicos são necessários até que se possa utilizar a técnica de FU ou esta otimizada com o uso de microbolhas, mas o futuro da terapia génica em tumores cerebrais é promissor e pretende trazer maior qualidade na entrega de terapias aos doentes, sendo que estas desta forma possam ser mais eficazes no combate à doença, sem que haja consequências graves para os mesmos, proporcionando assim uma melhor qualidade de vida para doentes com tumores cerebrais⁽⁵⁸⁾.

4. Patentes da Técnica de FU com aplicações a nível cerebral

Patente	Autor(es)	Requerente	Data de prioridade
Método e avaliação da curva de recuperação da BHE	Yang Feng-Yi e Chung I-Fang	Universidade Nat Yang Ming	2013-09-06
Sistemas e métodos em tempo real, para um acompanhamento transcraniano da abertura da BHE	Konofagou Elisa e Teichert Tobias	Universidade da Colômbia	2013-09-03
Sistemas e métodos para aplicação da Focagem de ultrassons transcraniana	Tyler William e Sato Tomokazu	Think Inc	2013-04-26
Sistemas e métodos para controlar o tratamento de focagem de ultrassons	O'Reilly Meaghan Anne e HynnenKullervo Henrik	Sunnybrook Health Sciences CT	2011-06-29
Sistema para imagem de ultrassons transcraniana	Troyansky Lidror	Troyansky Lidror	2012-07-30
Tratamento de doenças cérebro através ultrassons na entrega e pesquisa de agentes terapêuticos	Wei Kuo-Chen e Liu Hao-Li	Wei Kuo-Chen e Liu Hao-Li	2010-10-15
Aparelho não invasivo e de baixa frequência de ultrassons para terapia no cérebro	Liu Hao-Li e Huang Wen-Cheng	Universidade Chang Gung	2008-07-11
Sistema da matriz das fases de focagem de ultrassons em múltiplos canais do hemisfério para uso biomédico	Liu Hao-Li e Guo Zhen-Hao	Universidade Chang Gung	2007-06-14
Neuromodulação dos alvos do cérebro usando a focagem de ultrassons	Mishelevich David	-	2009-11-11
Uso biomédico do aparelho de focagem de ultrassons de múltiplos canais no hemisfério	Liu Hao-Li e Guo Zhen-Hao	Universidade Chang Gung	2007-12-10
Sistemas e métodos para a abertura da BHE com utilizando a focagem de ultrassons	Konofagou Elisa e Choi James	-	2005-09-19
Sistemas e métodos para aplicar um conjunto de focagem de ultrassons	Friedman Zvi e Maor Dov	Insightec Txsonics Ltd	2000-11-28

Tabela 5. Patentes relacionadas com a Técnica de FU com aplicações cerebrais.(Adaptado do site: <https://worldwide.espacenet.com/>)

5. Ensaio Clínicos com a aplicação da Técnica de FU em doenças cerebrais

Estudo	Estado do estudo	Patrocinador	Fase	Data de receção
Estudo de segurança usando a focagem de ultrassons controlada pela MRI transcraniana no tratamento da dor neuropática	Desconhecido	Hospital Pediátrico da Universidade, Zurique	I	27 de Abril de 2012
Estudo de viabilidade para tumores cerebrais usando a focagem de ultrassons controlada pela MRI	Recrutamento	InSightec	I	2 de Setembro de 2005
Focagem de ultrassons controlada pela MRI no tratamento de tumores cerebrais	Recrutamento	Hospital Pediátrico da Universidade, Zurique	I	29 de maio de 2012
Abertura da Barreira Hematoencefálica usando a focagem de ultrassons controlada pela MRI transcraniana	Recrutamento	InSightec	-	12 de Janeiro de 2015
Focagem de ultrassons controlada por MRI no núcleo subtalâmico para o tratamento da doença de Parkinson	Recrutamento	InSightec	-	18 de Setembro de 2014
Focagem de ultrassons controlada por MRI para o tratamento da doença de Parkinson	Recrutamento	InSightec	-	28 de Novembro de 2012
Focagem de ultrassons controlada por MRI no <i>Globus pallidum</i> para o tratamento da doença de Parkinson	Recrutamento	InSightec	-	8 de outubro de 2014
Focagem de ultrassons controlada por MRI na palidotomia unilateral para o tratamento da doença de Parkinson	Recrutamento	InSightec	-	12 de Janeiro de 2015

Tabela 6. Ensaio Clínicos em curso com a aplicação da Técnica de FU a nível cerebral.(Adaptado do site: <https://clinicaltrials.gov/>)

6. Empresas produtoras de dispositivos de FU

Empresas	Fins Terapêuticos/ Investigação	País
Alpinion Medical Systems	Cancro da cabeça e pescoço	Coreia do Sul
FUS Instruments Inc.	Passagem pela Barreira Hematoencefálica	Canadá
Imasonic	Tumores cerebrais	França
Insightec Ltd.	Neurocirurgias	Israel
Medsonic	Tumores cerebrais	Chipre
Promedica Bioelectronics S.R.L.	Neurocirurgias	Itália

Tabela 7. Empresas que produzem dispositivos que utilizam a Técnica de focagem de ultrassons com fins terapêuticos e de investigação. (Adaptado do site: <http://www.fusfoundation.org/for-clinicians/resources/manufacturers>)

7. Discussão e Conclusão

O cérebro é um órgão extraordinariamente complexo e altamente especializado do qual ainda há muito por explorar. A BHE funciona como um escudo que protege o cérebro de todos os agentes patogénicos limitando também o acesso de agentes terapêuticos. Atualmente a maioria dos estudos passa por tentar quebrar as ligações das células endoteliais JAs, que formam a BHE. O principal objetivo de quebrar as ligações é permitir a entrega de agentes terapêuticos para o cérebro, sendo as JA alvos atraentes para a abertura temporária da BHE.

Os sistemas convencionais não específicos que permitiam a abertura da BHE ou pelo menos aumentar a sua permeabilidade carecem de especificidade e eficácia, dado que permeabilizam a BHE por completo, não permitindo o controlo rigoroso das doses dos agentes terapêuticos que entram em contacto com o cérebro. Além disso, estes sistemas podem causar danos irreversíveis na BHE, podendo causar uma abertura permanente tendo efeitos nocivos para o cérebro.

Atualmente, a abertura da BHE, através da FU juntamente com as microbolhas, é um novo método, bastante promissor, para de uma forma não invasiva, localizada e reversível, melhorar a entrega direcionada de agentes terapêuticos em tumores do SNC, proporcionando uma maior eficácia do tratamento de quimioterapia e evitando a cirurgia. Através desta técnica é possível permitir a abertura da BHE em determinada região específica, durante algumas horas, sem causar danos irreversíveis, visto que após algumas horas, no máximo 24 horas, as JA voltam a reconstituir-se, sem danos evidentes.

Além disso, as microbolhas não só são utilizadas como um agente de contraste para diagnóstico de ultrassonografia, mas também proporcionam a possibilidade de uma entrega de agentes terapêuticos no cérebro quando combinado com FU. Estas podem facilitar a abertura da BHE, uma vez que é utilizada menos intensidade de ondas de ultrassom, assim como menos repetições das mesmas. Recentemente foi descoberto que também é possível ligar agentes terapêuticos às microbolhas permitindo assim uma entrega mais específica e personalizada dos mesmos.

No entanto, apesar das vantagens da abertura da BHE, suspeita-se que a interação entre as microbolhas e a FU possa induzir efeitos colaterais, como por exemplo, a formação de aglomerados de glóbulos vermelhos (petéquias) micro-hemorragias intracerebrais, edema, lesões nos neurónios, apoptose celular e inflamação. Estes efeitos podem ser provocados

pela sobre-excitação dos ultrassons (por exemplo, excessiva da pressão acústica ou duração excessiva de ultrassons) ou sobre-dosagem de microbolhas.

Estudos pré-clínicos sugerem que esta técnica pode facilitar a entrega de agentes terapêuticos para o cérebro, assim como, proporcionar a entrega seletiva e orientada. Esta técnica já foi utilizada para facilitar a entrega de anticorpos, agentes quimioterápicos, nanopartículas, e vetores virais, agentes utilizados no tratamento de tumores cerebrais e doenças neurodegenerativas, constituindo uma promessa no avanço molecular da neuro-oncologia.

As aplicações de FU em modelos de tumores cerebrais em animais demonstraram uma correlação entre a diminuição da progressão do tumor com a aplicação dos ultrassons, para a entrega do agente terapêutico.

Estudos futuros têm potencial tanto para o conhecimento biológico fundamental como para descobertas terapêuticas críticas. No entanto, a questão que permanece é se a abertura da BHE juntamente com a interação terapia-alvo irá melhorar a sobrevida do paciente. Vários investigadores de diversas áreas estão a trabalhar em conjunto para melhorar a capacidade de penetração da BHE de forma a permitir que novas terapias possam atingir os tumores no cérebro. Espera-se que a técnica de FU com as microbolhas seja aplicada em humanos, de forma a produzir uma terapêutica dirigida, não invasiva, eficaz, evitando efeitos nocivos para os doentes.

Referências

1. Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature*. 2009;457(7233):1142-5.
2. Koch C, Reid RC. Neuroscience: Observatories of the mind. *Nature*. 2012;483(7390):397-8.
3. Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(4):1298-309.
4. Quan T, Li J, Zhou H, Li S, Zheng T, Yang Z, et al. Digital reconstruction of the cell body in dense neural circuits using a spherical-coordinated variational model. *Scientific reports*. 2014;4:4970.
5. Jbabdi S, Behrens TE. Long-range connectomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1305:83-93.
6. Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, Wang C, Wickersham I, Wall NR, et al. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature*. 2011;472(7342):191-6.
7. Osten P, Margrie TW. Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nature methods*. 2013;10(6):515-23.
8. Lichtman JW, Denk W. The big and the small: challenges of imaging the brain's circuits. *Science*. 2011;334(6056):618-23.
9. Parekh R, Ascoli GA. Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience. *Neuron*. 2013;77(6):1017-38.
10. Huang ZJ. Toward a genetic dissection of cortical circuits in the mouse. *Neuron*. 2014;83(6):1284-302.
11. Davson H. Review lecture. The blood-brain barrier. *The Journal of physiology*. 1976;255(1):1-28.
12. Wiesendanger M. Constantin von Monakow (1853-1930): a pioneer in interdisciplinary brain research and a humanist. *Comptes rendus biologies*. 2006;329(5-6):406-18.
13. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical research*. 2009;34(12):2067-77.

14. Banks WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum of nutrition*. 2010;63:102-10.
15. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques*. 2003;61:39-78.
16. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;38:16-25.
17. Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):26-32.
18. Malfitano AM, Laezza C, Saccomanni G, Tuccinardi T, Manera C, Martinelli A, et al. Immune-modulation and properties of absorption and blood brain barrier permeability of 1,8-naphthyridine derivatives. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2013;8(5):1077-86.
19. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of neurovirology*. 1999;5(6):556-69.
20. Staddon J, Ratcliffe M, Morgan L, Hirase T, Smales C, Rubin L. Protein phosphorylation and the regulation of cell-cell junctions in brain endothelial cells. *Heart and vessels*. 1997;Suppl 12:106-9.
21. Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Current neuropharmacology*. 2008;6(3):179-92.
22. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004;84(3):869-901.
23. Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:402593.
24. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178-201.
25. Pereira A, Jr., Furlan FA. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in neurobiology*. 2010;92(3):405-20.
26. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(2):87-99.

27. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews*. 2010;64(2):328-63.
28. Willis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJ, Guerin CJ, et al. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*. 2004;45(4):325-37.
29. Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwizdzinski E, Simburger E, Naftolin F, et al. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(6):647-9.
30. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 1988;239(4837):290-2.
31. Zenker D, Begley D, Bratzke H, Rubsamen-Waigmann H, von Briesen H. Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *The Journal of physiology*. 2003;551(Pt 3):1023-32.
32. Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, et al. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*. 2005;51(4):297-305.
33. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 2005;97(6):512-23.
34. Bryan BA, D'Amore PA. Pericyte isolation and use in endothelial/pericyte coculture models. *Methods in enzymology*. 2008;443:315-31.
35. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;468(7323):562-6.
36. Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain research*. 2010;1347:1-10.
37. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(4):842-57.
38. Schoknecht K, David Y, Heinemann U. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;38:35-42.
39. Archer DP, Ravussin PA. [Role of blood-brain barrier in cerebral homeostasis]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 1994;13(1):57-61.

40. Rojas H, Ritter C, Pizzol FD. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Revista Brasileira de terapia intensiva*. 2011;23(2):222-7.
41. DeAngelis LM. Brain tumors. *The New England journal of medicine*. 2001;344(2):114-23.
42. Chintagumpala M, Gajjar A. Brain tumors. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):167-78.
43. Derouesne C. Brain tumors, cognitive and mental disorders in adults. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil*. 2015;13(2):187-94.
44. McCarthy BJ, Surawicz T, Bruner JM, Kruchko C, Davis F. Consensus Conference on Brain Tumor Definition for registration. November 10, 2000. *Neuro-oncology*. 2002;4(2):134-45.
45. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology*. 2002;4(4):278-99.
46. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 1993;3(3):255-68.
47. Lym RL, Ostrom QT, Kruchko C, Couce M, Brat DJ, Louis DN, et al. Completeness and concordancy of WHO grade assignment for brain and central nervous system tumors in the United States, 2004-2011. *Journal of neuro-oncology*. 2015;123(1):43-51.
48. Lovely MP. Symptom management of brain tumor patients. *Seminars in oncology nursing*. 2004;20(4):273-83.
49. Abbott NJ, Revest PA. Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1991;3(1):39-72.
50. Neuwelt EA, Barnett PA, Bigner DD, Frenkel EP. Effects of adrenal cortical steroids and osmotic blood-brain barrier opening on methotrexate delivery to gliomas in the rodent: the factor of the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(14):4420-3.
51. Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cellular and molecular neurobiology*. 2000;20(2):217-30.

52. Lee HJ, Zhang Y, Pardridge WM. Blood-brain barrier disruption following the internal carotid arterial perfusion of alkyl glycerols. *Journal of drug targeting*. 2002;10(6):463-7.
53. Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT. The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(2):105-23.
54. Sanovich E, Bartus RT, Friden PM, Dean RL, Le HQ, Brightman MW. Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7. *Brain research*. 1995;705(1-2):125-35.
55. Emerich DF, Snodgrass P, Dean R, Agostino M, Hasler B, Pink M, et al. Enhanced delivery of carboplatin into brain tumours with intravenous Cereport (RMP-7): dramatic differences and insight gained from dosing parameters. *Br J Cancer*. 1999;80(7):964-70.
56. Prados MD, Schold SJS, Fine HA, Jaeckle K, Hochberg F, Mechtler L, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2003;5(2):96-103.
57. Warren K, Jakacki R, Widemann B, Aikin A, Libucha M, Packer R, et al. Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2006;58(3):343-7.
58. Etame AB, Diaz RJ, Smith CA, Mainprize TG, Hynynen K, Rutka JT. Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology. *Neurosurg Focus*. 2012;32(1):E3.
59. Haroun RI, Brem H. Local drug delivery. *Current opinion in oncology*. 2000;12(3):187-93.
60. Huang Y, Hynynen K. MR-guided focused ultrasound for brain ablation and blood-brain barrier disruption. *Methods Mol Biol*. 2011;711:579-93.
61. Hynynen K, McDannold N, Sheikov NA, Jolesz FA, Vykhodtseva N. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *NeuroImage*. 2005;24(1):12-20.
62. Lynn JG, Putnam TJ. Histology of Cerebral Lesions Produced by Focused Ultrasound. *The American journal of pathology*. 1944;20(3):637-49.
63. Fry WJ, Fry FJ. Fundamental neurological research and human neurosurgery using intense ultrasound. *IRE Trans Med Electron*. 1960;ME-7:166-81.

64. Ballantine HT, Jr., Bell E, Manlapaz J. Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound. *Journal of neurosurgery*. 1960;17:858-76.
65. Ma CJ, Chen YC, Chen SF, Huo PD, Luo AX, Zhou YL, et al. Effects of diagnostic ultrasound on sister chromatid exchange frequencies of the amniotic fluid cells of the pregnant women. *Jinrui Idengaku Zasshi*. 1987;32(4):329-33.
66. Meyers R, Fry WJ, Fry FJ, Dreyer LL, Schultz DF, Noyes RF. Early experiences with ultrasonic irradiation of the pallidofugal and nigral complexes in hyperkinetic and hypertonic disorders. *Journal of neurosurgery*. 1959;16(1):32-54.
67. Heimbürger RF. Ultrasound augmentation of central nervous system tumor therapy. *Indiana Med*. 1985;78(6):469-76.
68. Hynynen K, McDannold N. MRI guided and monitored focused ultrasound thermal ablation methods: a review of progress. *Int J Hyperthermia*. 2004;20(7):725-37.
69. Ishihara Y, Calderon A, Watanabe H, Okamoto K, Suzuki Y, Kuroda K, et al. A precise and fast temperature mapping using water proton chemical shift. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1995;34(6):814-23.
70. McDannold N, Clement GT, Black P, Jolesz F, Hynynen K. Transcranial magnetic resonance imaging- guided focused ultrasound surgery of brain tumors: initial findings in 3 patients. *Neurosurgery*. 2010;66(2):323-32; discussion 32.
71. Lipsman N, Schwartz ML, Huang Y, Lee L, Sankar T, Chapman M, et al. MR-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: a proof-of-concept study. *The Lancet Neurology*. 2013;12(5):462-8.
72. Elias WJ, Huss D, Voss T, Loomba J, Khaled M, Zadicario E, et al. A pilot study of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *The New England journal of medicine*. 2013;369(7):640-8.
73. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2003;86:555-8.
74. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology*. 2001;220(3):640-6.
75. McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Jolesz FA, Hynynen K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound in medicine & biology*. 2005;31(11):1527-37.

76. Mesiwala AH, Farrell L, Wenzel HJ, Silbergeld DL, Crum LA, Winn HR, et al. High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo. *Ultrasound in medicine & biology*. 2002;28(3):389-400.
77. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Weissleder R, Jolesz FA, et al. Focal disruption of the blood-brain barrier due to 260-kHz ultrasound bursts: a method for molecular imaging and targeted drug delivery. *Journal of neurosurgery*. 2006;105(3):445-54.
78. Hynynen K. Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(10):1209-17.
79. McDannold NJ, Vykhodtseva NI, Hynynen K. Microbubble contrast agent with focused ultrasound to create brain lesions at low power levels: MR imaging and histologic study in rabbits. *Radiology*. 2006;241(1):95-106.
80. Fan CH, Ting CY, Chang YC, Wei KC, Liu HL, Yeh CK. Drug-loaded bubbles with matched focused ultrasound excitation for concurrent blood-brain barrier opening and brain-tumor drug delivery. *Acta Biomater*. 2015;15:89-101.
81. Chung DJ, Cho SH, Lee JM, Hahn ST. Effect of microbubble contrast agent during high intensity focused ultrasound ablation on rabbit liver in vivo. *Eur J Radiol*. 2012;81(4):e519-23.
82. Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2008;66(2):274-80.
83. Sheikov N, McDannold N, Sharma S, Hynynen K. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound in medicine & biology*. 2008;34(7):1093-104.
84. Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*. 1968;3(5):356-66.
85. Quiaia E. Microbubble ultrasound contrast agents: an update. *European radiology*. 2007;17(8):1995-2008.
86. Frinking PJ, Bouakaz A, Kirkhorn J, Ten Cate FJ, de Jong N. Ultrasound contrast imaging: current and new potential methods. *Ultrasound in medicine & biology*. 2000;26(6):965-75.
87. Dayton PA, Ferrara KW. Targeted imaging using ultrasound. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2002;16(4):362-77.

88. Foster FS, Burns PN, Simpson DH, Wilson SR, Christopher DA, Goertz DE. Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation. *Cancer metastasis reviews*. 2000;19(1-2):131-8.
89. Liu HL, Fan CH, Ting CY, Yeh CK. Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: current progress and overview. *Theranostics*. 2014;4(4):432-44.
90. Kang ST, Yeh CK. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. *Chang Gung Med J*. 2012;35(2):125-39.
91. Juffermans LJ, Meijering DB, van Wamel A, Henning RH, Kooiman K, Emmer M, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of therapeutic compounds: ICIN Report Project 49: Drug and gene delivery through ultrasound and microbubbles. *Neth Heart J*. 2009;17(2):82-6.
92. Chappell JC, Song J, Klibanov AL, Price RJ. Ultrasonic microbubble destruction stimulates therapeutic arteriogenesis via the CD18-dependent recruitment of bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(6):1117-22.
93. Sboros V. Response of contrast agents to ultrasound. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(10):1117-36.
94. Johnson CA, Miller RJ, O'Brien WD, Jr. Ultrasound contrast agents affect the angiogenic response. *J Ultrasound Med*. 2011;30(7):933-41.
95. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(3):255-60.
96. Liu Y, Yi S, Zhang J, Fang Z, Zhou F, Jia W, et al. Effect of microbubble-enhanced ultrasound on prostate permeability: a potential therapeutic method for prostate disease. *Urology*. 2013;81(4):921 e1-7.
97. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:229-48.
98. van Wamel A, Kooiman K, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, de Jong N. Ultrasound microbubble induced endothelial cell permeability. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;116(2):e100-2.
99. Bekeredjian R, Kroll RD, Fein E, Tinkov S, Coester C, Winter G, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction increases capillary permeability in hepatomas. *Ultrasound in medicine & biology*. 2007;33(10):1592-8.

100. Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Advanced drug delivery reviews*. 2004;56(9):1291-314.
101. Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(10):1153-66.
102. Lum AF, Borden MA, Dayton PA, Kruse DE, Simon SI, Ferrara KW. Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;111(1-2):128-34.
103. Zhao S, Borden M, Bloch SH, Kruse D, Ferrara KW, Dayton PA. Radiation-force assisted targeting facilitates ultrasonic molecular imaging. *Molecular imaging*. 2004;3(3):135-48.
104. Wang Y, Wang H, Guo Y, Ning C, Liu B, Cheng HD, et al. Novel computer-aided diagnosis algorithms on ultrasound image: effects on solid breast masses discrimination. *J Digit Imaging*. 2010;23(5):581-91.
105. McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K. Targeted disruption of the blood-brain barrier with focused ultrasound: association with cavitation activity. *Phys Med Biol*. 2006;51(4):793-807.
106. Tung YS, Vlachos F, Choi JJ, Deffieux T, Selert K, Konofagou EE. In vivo transcranial cavitation threshold detection during ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice. *Phys Med Biol*. 2010;55(20):6141-55.
107. Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound in medicine & biology*. 2004;30(4):519-26.
108. Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*. 2004;30(7):979-89.
109. Dayton P, Klibanov A, Brandenburger G, Ferrara K. Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*. 1999;25(8):1195-201.
110. Chen H, Kreider W, Brayman AA, Bailey MR, Matula TJ. Blood vessel deformations on microsecond time scales by ultrasonic cavitation. *Physical review letters*. 2011;106(3):034301.
111. Sassaroli E, Hynynen K. Resonance frequency of microbubbles in small blood vessels: a numerical study. *Phys Med Biol*. 2005;50(22):5293-305.

112. Cho EE, Drazic J, Ganguly M, Stefanovic B, Hynynen K. Two-photon fluorescence microscopy study of cerebrovascular dynamics in ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(9):1852-62.

113. Park J, Zhang Y, Vykhodtseva N, Jolesz FA, McDannold NJ. The kinetics of blood brain barrier permeability and targeted doxorubicin delivery into brain induced by focused ultrasound. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;162(1):134-42.

114. McDannold N, Arvanitis CD, Vykhodtseva N, Livingstone MS. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer research*. 2012;72(14):3652-63.

115. Marty B, Larrat B, Van Landeghem M, Robic C, Robert P, Port M, et al. Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012;32(10):1948-58.

116. Howles GP, Bing KF, Qi Y, Rosenzweig SJ, Nightingale KR, Johnson GA. Contrast-enhanced in vivo magnetic resonance microscopy of the mouse brain enabled by noninvasive opening of the blood-brain barrier with ultrasound. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2010;64(4):995-1004.

117. Samiotaki G, Vlachos F, Tung YS, Konofagou EE. A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening reversibility in vivo using MRI. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2012;67(3):769-77.

118. Baseri B, Choi JJ, Tung YS, Konofagou EE. Multi-modality safety assessment of blood-brain barrier opening using focused ultrasound and definity microbubbles: a short-term study. *Ultrasound in medicine & biology*. 2010;36(9):1445-59.

119. Liu HL, Wai YY, Chen WS, Chen JC, Hsu PH, Wu XY, et al. Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound in medicine & biology*. 2008;34(4):598-606.

120. Liu HL, Wai YY, Hsu PH, Lyu LA, Wu JS, Shen CR, et al. In vivo assessment of macrophage CNS infiltration during disruption of the blood-brain barrier with focused

ultrasound: a magnetic resonance imaging study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(3):674.

121. Jalali S, Huang Y, Dumont DJ, Hynynen K. Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats. *BMC neurology*. 2010;10:114.

122. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Molecular neurobiology*. 2006;34(3):249-70.

123. Nath R, McGinnis K, Dutta S, Shivers B, Wang KK. Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Cell Mol Biol Lett*. 2001;6(2):173-84.

124. Harada J, Sugimoto M. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Japanese journal of pharmacology*. 1999;79(3):369-78.

125. Park J, Fan Z, Kumon RE, El-Sayed ME, Deng CX. Modulation of intracellular Ca²⁺ concentration in brain microvascular endothelial cells in vitro by acoustic cavitation. *Ultrasound in medicine & biology*. 2010;36(7):1176-87.

126. Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(4):1085-90.

127. Sulaiman WA, Singh M. Minimally invasive versus open transforaminal lumbar interbody fusion for degenerative spondylolisthesis grades 1-2: patient-reported clinical outcomes and cost-utility analysis. *Ochsner J*. 2014;14(1):32-7.

128. Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, et al. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4501-6.

129. Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, et al. Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(9):3745-51.

130. Jordao JF, Ayala-Grosso CA, Markham K, Huang Y, Chopra R, McLaurin J, et al. Antibodies targeted to the brain with image-guided focused ultrasound reduces amyloid-

beta plaque load in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one*. 2010;5(5):e10549.

131. Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(31):11719-23.

132. Judy KD, Olivi A, Buahin KG, Domb A, Epstein JI, Colvin OM, et al. Effectiveness of controlled release of a cyclophosphamide derivative with polymers against rat gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1995;82(3):481-6.

133. Lidar Z, Mardor Y, Jonas T, Pfeffer R, Faibel M, Nass D, et al. Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *Journal of neurosurgery*. 2004;100(3):472-9.

134. Parney IF, Kunwar S, McDermott M, Berger M, Prados M, Cha S, et al. Neuroradiographic changes following convection-enhanced delivery of the recombinant cytotoxin interleukin 13-PE38QQR for recurrent malignant glioma. *Journal of neurosurgery*. 2005;102(2):267-75.

135. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, et al. A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. *Journal of neurosurgery*. 1992;76(5):772-81.

136. Treat LH, McDannold N, Vykhodtseva N, Zhang Y, Tam K, Hynynen K. Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(4):901-7.

137. Li P, Zhu M, Xu Y, Zhao Y, Gao S, Liu Z, et al. Impact of microbubble enhanced, pulsed, focused ultrasound on tumor circulation of subcutaneous VX2 cancer. *Chinese medical journal*. 2014;127(14):2605-11.

138. Mei J, Cheng Y, Song Y, Yang Y, Wang F, Liu Y, 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):871-80.

139. Liu HL, Hua MY, Chen PY, Chu PC, Pan CH, Yang HW, et al. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. *Radiology*. 2010;255(2):415-25.

140. Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, et al. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(13):4678-84.
141. Cheng Y, A CS, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(32):10643-7.
142. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug delivery*. 2004;11(3):169-83.
143. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008;29(12):1912-9.
144. Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Khlebtsov BN, Kogan BY, Akchurin GG, et al. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery. *J Biophotonics*. 2009;2(5):292-302.
145. Liu HL, Hua MY, Yang HW, Huang CY, Chu PC, Wu JS, et al. Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(34):15205-10.
146. Fulci G, Chiocca EA. The status of gene therapy for brain tumors. *Expert opinion on biological therapy*. 2007;7(2):197-208.
147. Murphy AM, Rabkin SD. Current status of gene therapy for brain tumors. *Transl Res*. 2013;161(4):339-54.
148. Oshiro EM, Viola JJ, Oldfield EH, Walbridge S, Bacher J, Frank JA, et al. Toxicity studies and distribution dynamics of retroviral vectors following intrathecal administration of retroviral vector-producer cells. *Cancer Gene Ther*. 1995;2(2):87-95.
149. Barnett FH, Rainov NG, Ikeda K, Schuback DE, Elliott P, Kramm CM, et al. Selective delivery of herpes virus vectors to experimental brain tumors using RMP-7. *Cancer Gene Ther*. 1999;6(1):14-20.
150. Nilaver G, Muldoon LL, Kroll RA, Pagel MA, Breakefield XO, Davidson BL, et al. Delivery of herpesvirus and adenovirus to nude rat intracerebral tumors after osmotic blood-brain barrier disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(21):9829-33.

151. Sheikov N, McDannold N, Jolesz F, Zhang YZ, Tam K, Hynynen K. 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 in medicine & biology*. 2006;32(9):1399-409.

152. Kuliszewski MA, Kobulnik J, Lindner JR, Stewart DJ, Leong-Poi H. Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(5):895-902.

153. Song S, Shen Z, Chen L, Brayman AA, Miao CH. Explorations of high-intensity therapeutic ultrasound and microbubble-mediated gene delivery in mouse liver. *Gene therapy*. 2011;18(10):1006-14.

154. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene therapy*. 2002;9(6):372-80.

155. Shimamura M, Sato N, Taniyama Y, Yamamoto S, Endoh M, Kurinami H, et al. Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound. *Gene therapy*. 2004;11(20):1532-9.

156. Chen ZY, Liang K, Qiu RX. 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;29:152.

