

Biosusceptometria AC Multicanal para avaliação *in vivo* de perfis farmacocinéticos de nanopartículas magnéticas por imagens

GUILHERME AUGUSTO SOARES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia

Botucatu

2018

**Biosusceptometria AC Multicanal para avaliação
in vivo de perfis farmacocinéticos de
nanopartículas magnéticas por imagens**

GUILHERME AUGUSTO SOARES

PROF. DR. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia e Biotecnologia

Botucatu

2018

Dedico esse trabalho à minha família, pois sem vocês eu não seria nada. Dedico de forma especial à minha sobrinha Helena Rezende Soares, que muita alegria nos trouxe. E também à Tatiana Giovanini Garcia, meu grande amor.

“O sucesso é ir de fracasso em
fracasso sem perder entusiasmo”

Winston Churchill

Agradecimentos

Agradeço à Deus por estar comigo até agora. Agradeço aos meus pais, Maria Célia e Luiz Antônio pelo amor incondicional e apoio em toda minha vida, principalmente nessa jornada em Botucatu. Agradeço também meus dois irmãos, Luiz Felipe e Leonardo, por nunca terem medido esforços para me ajudar em todas situações, muitas vezes realizando até o impossível para me ajudar. Vocês são exemplos de homens com grande caráter. Ao meu tio Rubens, por sempre estar ao lado de minha mãe, e por ter participado na minha criação. Agradeço a essas pessoas por ter acreditado e confiado em mim mesmo estando longe.

Agradeço à minha namorada Tatiana Giovanini por ter entrado em minha vida, e estar ao meu lado nos piores momentos, me dando força e nunca me deixando desanimar. Agradeço também à sua família, por me receber tão bem em Ribeirão Preto.

Ao meu professor José Ricardo de Arruda Miranda, a quem considero um grande amigo, por ter me orientado durante essa fase de maneira incrível, demonstrando todo o seu saber de forma acessível, sendo um exemplo de pesquisador e professor, de modo que me influenciou em continuar seguindo seus passos. Agradeço também a sua esposa, Professora Diana Miranda, por me auxiliar em várias situações pontuais e proporcionar um ambiente familiar ao laboratório.

Agradeço aos meus amigos André Próspero, Marcos Calabresi, Caio Quini, que sempre me ajudaram, comportando-se muitas vezes como meus orientadores ao se importarem comigo, muitas vezes corrigindo meus erros, ensinando-me significados no qual ainda estou aprendendo. Ao Allan Alves, pela atenção e auxílio em momentos decisivos dessa fase.

Aos meus amigos Gustavo Moretto, Ronaldo Matos e Leonardo Antônio, por me auxiliado no início desse projeto. Aos membros do BIOMAG que me ajudaram inúmeras vezes. Aos amigos dos laboratórios LAFAR e BIOMAG, pela convivência e pela fraternidade que se tem com todos.

Aos amigos e irmãos da república RT, que através de companheirismo e muita alegria, momentos difíceis eram contornados. Em especial, a quem tive mais contato: Diego Marcelino, Gabriel Perez, Mateus Pontim , Kayque Fracarolli, Inaiã Vieira, Vitor Hugo, Hugo Tadashi, Rodolfo Cicolin, Rafael Gelaleti, Erick Stoppa, Pedro Pellicano e Bruno Gomes.

A todos que de forma direta e indireta participaram da realização desse trabalho como em minha vida, meu grande obrigado.

RESUMO

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma classe de nanopartículas que se destacam em áreas da saúde, principalmente em aplicações teranósticas. O potencial das NPMs é prejudicado em função da absorção hepática, considerando que o fígado é uma rede complexa de células inter-relacionadas responsável pela captação das NPMs. Apesar de vários estudos concentrados na área, ainda é pouco compreendido como cada estrutura hepática opera no processo de retirada das NPMs da circulação sanguínea. As técnicas de imagem tem proporcionado avanços no entendimento de eventos fisiológicos, facilitando sua visualização. Atualmente, há uma gama de modalidades responsáveis pela detecção e imageamento da biodistribuição das NPMs. Dentre essas técnicas de imagens, várias estão presentes apenas em hospitais ou em grandes centros de pesquisa. Esse trabalho tem como destaque, a aplicação de um novo método biomagnético, a Biosusceptometria AC (BAC), para a detecção *in vivo* de NPMs através de imagens. Fatores como ausência de radiação ionizante, versatilidade e alta resolução temporal são atributos do sistema frente às diversas técnicas de imagem. Neste estudo foi utilizado um novo arranjo do sistema, o sistema Multicanal BAC (ACB-MC), o qual permitiu a avaliação do processo de *clearance* das NPMs no sangue e seu posterior acúmulo no fígado em ratos *Wistar*. A partir das imagens dinâmicas obtidas e sua quantificação, foi proposta uma abordagem matemática a fim de auxiliar a farmacocinética de distribuição e acúmulo das NPMs. O sistema ACB-MC apresentou excelente resolução temporal e por meio das imagens sequenciais, foi possível a realização de um vídeo ilustrando a circulação e acúmulo das NPMs e posterior quantificação das constantes de transferência do compartimento vascular e estruturas hepáticas. O modelo farmacocinético apresentou forte correlação com os dados experimentais, sugerindo que o sistema ACB-MC pode ser um dispositivo de imagem

valioso e acessível para acessar características farmacocinéticas *in vivo* e em tempo real de NPMs.

Palavras-chave: Biosusceptometria AC, Nanopartículas Magnéticas, Imagens, Modelos Farmacocinéticos

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNPs) are widely used in healthy research areas, especially in therapeutic applications. The potential use of MNPs is diminished due to hepatic absorption, considering that the liver is a complex network of interrelated cells and the most responsible for MNP uptake. Although there have been many studies in this area, it is still unknown how the liver removes MNPs from the bloodstream. Imaging techniques have provided more understanding of physiological events, enhancing their visualization. Currently, there is a range of modalities able to detect and image the biodistribution of MNPs. Among these techniques, several are restricted to large hospitals and research centers. In this work, our aim was to highlight the application of a new biomagnetic method, Biosusceptometry AC (BAC), for *in vivo* detection of MNPs through images. When compared to other systems, BAC has some advantages such as the absence of ionizing radiation, versatility and high temporal resolution. In this study, a new system arrangement, the Multichannel BAC system (ACB-MC) was used. This allowed the evaluation of the clearance process of MNPs in the blood and their subsequent accumulation in the liver. Those experiments were performed in *Wistar* rats. From the quantification of the dynamic images, a mathematical approach was proposed to investigate the pharmacokinetics of distribution and accumulation of MNPs. The ACB-MC system presented excellent temporal resolution and through sequential images, a video was created to illustrate the circulation and accumulation process. In addition, the video permitted to quantify the transfer constants of the vascular compartment and hepatic structures. The pharmacokinetic model showed a strong correlation with experimental data, suggesting that the ACB-MC system can be a valuable and accessible imaging device to access *in vivo* and real-time pharmacokinetic characteristics of MNPs.

Keywords: AC Biosusceptometry, Magnetic Nanoparticles, Images, Pharmacokinetic Models

Sumário

Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Abreviações.....	16
Capítulo I - Revisão de Literatura	18
1. Introdução.....	19
1.1 Nanomedicina	19
1.2 Nanopartículas Magnéticas	20
1.3 Farmacocinética das Nanopartículas	22
1.4 Imagem.....	24
1.4.1 Técnicas de Imageamento de Nanopartículas	25
1.4.1.2 Tomografia Computadorizada (TC).....	30
1.4.1.3 Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) e Tomografia de Emissão de Fóton Único (SPECT)	32
1.4.1.4 Ultrassom	35
1.4.1.5 Imagem por Ressonância Magnética (MRI)	37
1.4.1.6 <i>Magnetic Particle Imaging</i> (MPI).....	40
1.5 Biosusceptometria AC (BAC).....	42
1.6 Farmacocinética	45
1.6.1 Modelos Compartimentais Farmacocinéticos de NPs.....	47
1.6.1.1 Modelo de Compartimento Linear	49
1.6.1.2 Modelo de Compartimento Não-Linear	50
2. Referências.....	52
Capítulo II – Artigo Científico.....	59
ABSTRACT	61
BACKGROUND	62
METHODS	64
Magnetic nanoparticles	64
ACB system	65
ACB Principles of Operation	65
ACB Multichannel System.....	65
Animal Experimentation	66
Data processing	67
Image Quantification.....	67
Pharmacokinetic model	68

Main mathematical description of the model	68
Implementation of the model	69
Analysis of model accuracy	69
RESULTS.....	70
Data processing and Image quantification	70
Model for biodistribution profile acquisition	72
Analysis of model accuracy	72
Transfer Rates	73
DISCUSSION.....	73
CONCLUSION	77
REFERENCES.....	78
SUPPLEMENTARY MATERIAL	86
Conclusão.....	92

Lista de Figuras

Figura 1. Sinusóide Hepático e suas estruturas. Retirado de (Samuelsson et al., 2017) 24

Figura 2. Imagem NIRF in vivo de nanopartículas fosfolipídicas com IR780 em ratos com

modelo de tumoral cerebral. O crescimento do tumor foi medido pela intensidade do sinal de bioluminescência (BLI). A) Os ratos portadores de tumores receberam nanopartículas fosfolipídicas com IR780 via administração caudal. As imagens de pós-injeção, sequencial BLI e NIRF foram tomadas em cada ponto de tempo. B) Imagem NIRF de cérebros de ratos ex vivo após a última imagem de corpo inteiro. C) Imagem NIRF representativa dos órgãos ex vivo (cérebro, pulmão, coração, fígado, baço, rins, estômago e intestinos, músculo inferior, pele. Retirado de (Li et al., 2017) 30

Figura 3. Imagens de Micro-CT em ratos: pré-contraste (a), contraste aprimorado às 6 h após a administrações de AuNP-PEG (b). Retirado (Xi et al., 2012)..... 32

Figura 4. Acúmulo de NPs radiomarcadas em tecidos tumorais pode ser visualizado por imagens de PET in vivo. Imagens de TC (esquerda) e associação de PET/CT (direita).

A) Imagem de TC e PET de NPs- ^{89}Zr -AI-HDL e B) Imagem de TC e PET de NPs- ^{89}Zr -PL-HDL 24 hs após a infusão. Abreviações: ^{89}Zr , zircônio; AI, apolilipoproteína; PL, fosfolipídio; HDL, lipoproteína de alta densidade. Retirado de (Perez-Medina et al., 2015)..... 34

Figura 5. Exemplo de imagem SPECT de NPs radiomarcadas com ^{111}In Índio.

Abreviações: L, Fígado; I, intestino; T, tumor; B, bexiga. Retirado de (Rangger et al., 2013)..... 35

Figura 6. Imagens representativas de contraste e ultrassonografia representativas no rim de coelho A) Pré- e (B) pós-administração de paclitaxel- NPs-PLGA (poli- ácido láctico-co-glicólico) – PEG. Esquerda, modo de contraste; direita, modo convencional. Retirado de (Ma et al., 2015)..... 37

Figura 7. Uso de NPMs para o imageamento do SRE. A) demonstra que os macrófagos do fígado incorporam as NPMs (Kim et al., 2006). B) apresenta imagem de lesões inflamatórias após a infusão de NPMs, é possível observar que a placa aterosclerótica (seta) rica em macrófagos pode ser detectada devido à sua forte diminuição na intensidade do sinal (Schmitz et al., 2001). C) demonstra como as NPMs podem ajudar a diferenciar os linfonodos metastáticos (setas) e saudáveis (cabeças de seta) em pacientes com carcinoma tonsilar (Mack et al., 2002). 40

Figura 8. Imagem MPI representativa mostrando a visualização da biodistribuição de células-tronco marcadas com NPMs após serem administradas via caudal de um rato. À esquerda, imagens realizadas logo após a infusão, a qual é possível observar maior acúmulo no pulmão. À direita, imagens realizadas com 12 dias após a infusão, demonstrando maior acúmulo no fígado e no baço (Tay et al., 2016). 42

Figura 9. Ilustração do sistema BAC Multicanal utilizado nesse trabalho..... 45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Técnicas utilizadas para o imageamento de NPMs	27
---	----

Lista de Abreviações

NPs- Nanopartículas

NPMs- Nanopartículas Magnéticas

MRI- *Magnetic Ressonance Imaging*

SRE- Sistema Retículo Endotelial

IV- Intravenosa

CK- Células de Kupffer

LSECs- Células Endoteliais Sinusoidais Hepáticas

OCNR- *Office of Cancer Nanotechnology Research*

PET- Tomografia por Emissão de Pósitron

TC- Tomografia Computadorizada

SPECT- Tomografia de Emissão de Fóton Único

US- Ultrassom

IO- Imagem Ótica

MPI- *Magnetic Particle Imaging*

Au-NPs- Nanopartículas de Ouro

QDs- Quantum Dots

NIRF- Imagem de fluorescência próximo do infravermelho

PEG- Polietilenoglicol

GD⁺³- Gadolínio

BAC- Biosusceptometria AC

FOV- *Field of View*

ADME- Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

AUC- Área Sob a Curva

Capítulo I - Revisão de Literatura

1. Introdução

1.1 Nanomedicina

Em 1959, o físico Richard P. Feynman proferiu a palestra de encerramento do encontro da Sociedade Americana de Física, intitulada “*There is a plenty of room at the bottom*”, que pode ser traduzido como: ‘Há muito espaço lá embaixo’. Nesta palestra o físico idealizava que a partir da manipulação dos materiais numa escala extremamente pequena, seria possível desenvolver revolucionários avanços em diversas áreas do conhecimento. Essa palestra pode ser considerada o ponto de partida para o desenvolvimento da Nanotecnologia.

A nanotecnologia é uma área de pesquisa que visa entender as propriedades e aplicar estruturas com dimensão na escala de nanômetros. Esta área destaca-se como uma ciência dinâmica e promissora, que possui características que permitem atuar em escala nanométrica utilizando-se de conhecimentos gerados por diversas áreas do conhecimento como: física, química, engenharia, medicina, biotecnologia e biomedicina (Ferrari, 2005).

A nanotecnologia se baseia fundamentalmente na compreensão, no controle e na reestruturação da matéria na ordem de nanômetros (ou seja, estruturas com dimensões menores do que 100 nm) para desenvolver materiais com propriedades e funções fundamentalmente novas. Esses novos materiais nanoestruturados fortificam perspectivas para grandes áreas de conhecimento, através de futuras aplicações tecnológicas.

Quando associada à medicina, a nanotecnologia recebe o nome de Nanomedicina. Através da utilização de nanomateriais na área médica, a nanomedicina atrai um grande número de pesquisadores devido ao grande desafio e possibilidades que apresenta, provocando um grande desenvolvimento para novas abordagens de aplicação.

Outro destaque da nanomedicina é a interdisciplinaridade que a esfera nanomédica exhibe, proporcionando principalmente aplicações que combinem ações terapêuticas e diagnósticas para solucionar questões relacionadas à clínica médica.

1.2 Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas (NPs) são objetos pequenos variando de 1 a 100 nm, e em sua composição podem conter uma gama de materiais. As nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma classe de nanopartículas que atraem um interesse significativo e se destacam em áreas da saúde, principalmente em aplicações biomédicas.

Alguns tipos de NPMs, compostas principalmente de óxido de ferro, já são utilizadas como agentes de contraste em Imageamento por Ressonância Magnética (MRI – do inglês *Magnetic Resonance Imaging*), se apresentando como uma interessante alternativa aos convencionais contrastes a base de gadolínio (Gale et al., 2015). Devido ao seu aspecto multifuncional, apresentam grande relevância, podendo ser utilizadas em marcação, acompanhamento e ativação celular *in vitro* e *in vivo*. Um exemplo de marcação e rastreamento de células no sistema biológico ocorre através da realização de culturas celulares *in vitro* marcadas com NPMs com posterior administração na circulação sistêmica. Atualmente, células troncos podem ser marcadas com NPMs e administradas em sistemas biológicos a fim de acompanhar estas células até o seu destino final (Cromer Berman et al., 2011).

Frequentemente, limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas próprias de algumas substâncias farmacológicas tornam seu uso restrito, contribuindo para que o fármaco apresente baixa eficácia, ausência de seletividade e dificuldades de se alcançar o alvo. Muitas vezes isso ocorre devido a barreiras fisiológicas ou mecanismos celulares (Medina et al., 2007). Os fármacos também podem ser rapidamente captados e retirados

da circulação sanguínea por mecanismos biológicos, como sistema retículo endotelial (SRE) (Vugmeyster et al., 2012), reduzindo sua biodisponibilidade. Outros fatores como excreção renal e baixa absorção no trato gastrointestinal podem afetar a biodisponibilidade do fármaco.

Existe uma gama de agentes antineoplásicos disponíveis para aplicações clínicas, no entanto sua baixa especificidade e alto volume de distribuição leva a efeitos tóxicos em tecidos saudáveis, o que, em muitos casos, pode limitar seu uso (Barbosa et al., 2015, Simpson et al., 2016). NPMs ligadas à fármacos podem atuar otimizando a vetorização desses antineoplásicos. Através de um campo magnético externo aplicado, é possível concentrar o complexo NPMs-fármaco no local desejado. O processo de entrega guiada (*“guided drug delivery”*) se destaca por proporcionar um aumento na eficácia terapêutica e redução na toxicidade em tecidos saudáveis (Ulbrich et al., 2016, Mahmoudi et al., 2011). Atualmente, o uso de nanopartículas magnéticas como portadores de fármacos na terapia direcionada oferece uma nova visão no tratamento do câncer, pois o uso de tais transportadores reduz consideravelmente os efeitos colaterais da quimioterapia convencional (Singh and Sahoo, 2014).

Outra aplicação significativa das NPMs através de suas propriedades magnéticas, surge na indução de resposta terapêutica via hipertermia. Na hipertermia, o tecido é exposto a altas temperaturas $\sim 41-47^{\circ}\text{C}$, (Purushotham and Ramanujan, 2010) objetivando destruir células cancerígenas, uma vez que estas são mais sensíveis a variação de temperatura em comparação às células saudáveis (Kumar and Mohammad, 2011). A hipertermia magnética é uma técnica que consiste em guiar as NPMs ao tecido alvo e aplicar um campo magnético de alta intensidade e com frequência específica, provocando o aquecimento das partículas e, conseqüentemente, do tecido de interesse (Kumar and Mohammad, 2011).

Devido as ações apresentadas em relação a utilização das NPMs, a associação de ações terapêuticas e diagnósticas, conferem a tais partículas um potencial teranóstico, ou seja, apresenta ações diagnósticas e terapêuticas simultâneas.

1.3 Farmacocinética das Nanopartículas

A biodistribuição e farmacocinéticas das NPMs é determinada por uma combinação de fatores que incluem desde a via de administração, as propriedades das NPMs e o ambiente fisiológico ao qual as nanopartículas são introduzidas (Alexis et al., 2008). Dependendo das aplicações biomédicas desejadas, as NPMs podem ser administradas via intravenosa (IV), via oral ou via intranasal (inalação). Os critérios próprios as NPMs como tamanho, forma, revestimento de superfície e a dosagem são manipuladas para evitar processos fisiológicos tais como a retirada da circulação, prolongando o tempo de circulação sanguínea (Almeida et al., 2011).

De forma geral, o destino das NPMs em um sistema biológico geralmente tem órgãos de preferência como fígado, baço, pulmões e rins, por se comportarem como órgãos de retenção e eliminação (Cole et al., 2011). Contudo, essa preferência pode ser alterada dependendo das características das NPMs, sendo as principais características atuantes nesse processo o tamanho e o tipo de revestimento (Sapsford et al., 2013).

Atualmente, os recentes estudos demonstram que as NPMs quando administradas intravenosamente circulam primeiramente no coração, e em seguida são capturadas pelo fígado (Moore et al., 2000, Gaumet et al., 2008). Isso ocorre principalmente devido a presença de capilares descontínuos e alta ação macrofágica neste órgão, resultando num efetivo aprisionamento das NPMs, e contribuindo para sua rápida retirada da circulação sanguínea (Saito et al., 2007).

Dessa forma, o monitoramento do fígado é essencial para o melhor entendimento do perfil de acúmulo e biodistribuição das NPMs no sistema biológico. Tem-se em vista ainda que o fígado é uma barreira importante para a entrega específica do sistema de nanopartículas injetadas via intravenosa, já que até 90% da dose geralmente é capturada por este órgão (Samuelsson et al., 2017, Gustafson et al., 2015). Apesar de muitos estudos concentrarem seus respectivos focos no acúmulo das NPMs no fígado, a compreensão das interações das NPMs com o tecido hepático ainda é limitada (Park et al., 2016).

O fígado é apontado como um complexo entrelaçamento de células profundamente correlacionadas, contextualizadas fundamentalmente por duas porções, parenquimal e não-parenquimal (Racanelli and Rehermann, 2006). A maior parte da região parenquimal é composta principalmente por hepatócitos. A porção não-parenquimal é organizada por diferentes conjuntos de células que incluem macrófagos residentes do fígado (Células de Kupffer - CK), células endoteliais sinusoidais hepáticas (LSECs) e células estreladas hepáticas (Racanelli and Rehermann, 2006, Bhatia et al., 2014).

O suprimento sanguíneo do fígado é realizado por duas vias diferentes, a veia porta e a artéria hepática (Abdel-Misih and Bloomston, 2010, Mishra et al., 2013). O endotélio celular que envolve os capilares sinusoidais hepáticos exibem descontinuidades capilares ou fenestras. Esse aspecto fenestrado, permite que o plasma sanguíneo interaja com os hepatócitos através do espaço de Disse, uma pequena região entre as camadas endotelial e a porção parenquimal (Herrnberger et al., 2014).

Em relação aos componentes celulares, próximas as fenestras sinusoidais estão posicionadas as CK. Consideradas os macrófagos residentes do fígado, essas células são consideradas responsáveis pela retenção celular de NPMs neste órgão (Gustafson et al., 2015). A figura 1 ilustra o sinusóide hepático e suas respectivas estruturas celulares.

Esses agentes fagocitários compõem o eficiente sistema reticuloendotelial (SRE), que faz parte do sistema imune, que por sua vez é encarregado pela captura de células danificadas, além de materiais estranhos, como bactérias, vírus e NPMs (Nie, 2010, Bertrand and Leroux, 2012) .

As CK constituem cerca de 80-90% da população total de macrófagos do corpo e são responsáveis pela maioria da atividade fagocitária no fígado (Bertrand and Leroux, 2012).

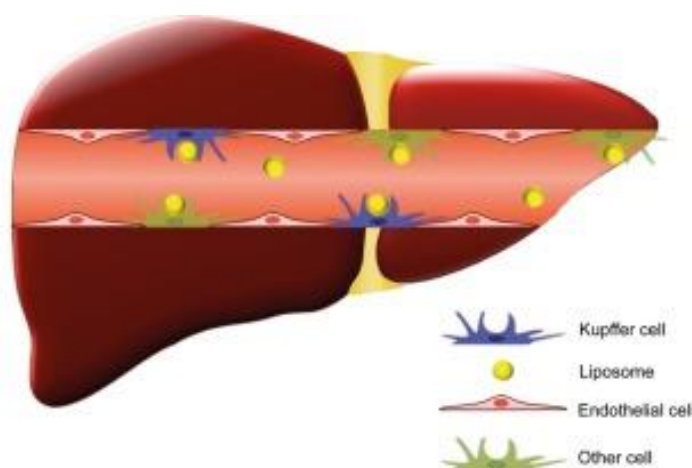


Figura 1. Sinusóide Hepático e suas estruturas. Retirado de (Samuelsson et al., 2017)

1.4 Imagem

Desde Galileu, já se afirmava que a imagem era “os olhos da ciência”. Através de diversas aplicações tecnológicas e especialmente devido às conexões entre a visão e a intuição de quem está visualizando, imagens são amplamente utilizadas na ciência (Kherlopian et al., 2008, Estelrich et al., 2015). Cada vez mais, em particular na área médica, pesquisadores são cativados a utilizar sistemas de imageamento para se avaliar os mais variados processos biológicos. Sistemas de imageamento se destacam pela capacidade de se verificar, caracterizar e quantificar processos físicos juntamente a

processos fisiológicos, resultando em tecnologia eficaz em diagnosticar mesmo em nível celular (Eils and Athale, 2003, James and Gambhir, 2012). Outra vantagem no desenvolvimento de tecnologias capazes de avaliar processos biológicos através de imagens, é a possibilidade destas contribuírem em futuros procedimentos terapêuticos.

Recentemente as nanopartículas estão se apresentando como agentes qualificados para fornecer abordagens que possam superar limitações em relação ao diagnóstico de câncer, principalmente (Koo et al., 2011). Combinando as propriedades que as NPMs possuem, como tamanho, carga superficial e revestimento com técnicas de detecção, pode-se facilitar o diagnóstico na região de interesse, demonstrando incrível potencial em ensaios pré-clínicos (Zhen Cheng, 2016, Mathiasen and Kastrup, 2013).

Prevendo o potencial das NPs como importante agente para diagnóstico através de imagens, em 2011 o Departamento de Pesquisa em Nanotecnologia para o Câncer (do inglês *Office of Cancer Nanotechnology Research*) (OCNR) dos Estados Unidos, reuniu pesquisadores que trabalhavam utilizando NPs para o estudo de câncer com imagens, com o intuito de atualizar o contexto e os desafios no desenvolvimento de novas NPs. Foram abordados temas como novas metodologias para realização de imagens a partir da sua detecção, com a intenção de trazer definitivamente a nanotecnologia para a clínica médica (Chapman et al., 2013).

1.4.1 Técnicas de Imageamento de Nanopartículas

As técnicas de imagem tem proporcionado avanços no entendimento de eventos fisiológicos, facilitando sua visualização. Essas técnicas permitem o diagnóstico de doenças e o reconhecimento de processos enfermos antecipadamente de forma que auxiliem seus tratamentos. Essas técnicas podem oferecer informações anatômicas e fisiológicas mas também detalhes de desempenho químico ou bioquímico

(Padmanabhan et al., 2016). A fim de proporcionar um tratamento eficaz ao paciente, é necessária uma imagem precisa de processos fisiológicos, particularmente no campo da oncologia (Baetke et al., 2015).

Em relação as NPMs, há uma grande número de modalidades responsáveis pelo imageamento destas imersas no organismo, como Tomografia Computadorizada, Imageamento por Ressonância Magnética (MRI – do inglês – *Magnetic Resonance Imaging*), Tomografia por Emissão de Póstron (PET) e Tomografia de Emissão de Fóton Único (SPECT) e Ultrassom (US).

Entre estes, alguns são considerados métodos diretos por não necessitarem de adição de qualquer outro material às NPMs para se realizar a detecção, nestes destacam-se o MRI e mais recentemente o *Magnetic Particle Imaging* (MPI) que serão abordados nas próximas seções. Os métodos indiretos, como por exemplo o PET, são as modalidades que necessitam adicionar material fluorescente ou radioativo à composição das NPMs que permitam sua detecção.

A fim de superar as limitações próprias de cada técnica e se beneficiar de suas características favoráveis, estão sendo desenvolvidas modalidades de imagem multifuncionais que podem oferecer ótimas informações tanto anatômicas como fisiológicas, simultaneamente. O caso mais comum é a combinação de MRI-PET/SPECT. Apesar do PET / SPECT oferecerem excelente sensibilidade, possuem baixa resolução espacial. MRI pode contribuir oferecendo alta resolução espacial em tecidos moles, além de que essa combinação gera menor radiação ionizante no paciente (Yang et al., 2011).

Esta seção apresenta as principais técnicas utilizadas para a detecção e consequente formação de imagens à base de NPs. A tabela 1 apresenta as principais técnicas responsáveis pelo imageamento das NPs atualmente.

Modalidade	Princípio Físico	NPs aplicada	Informação	Tempo de Imagem	Custo
------------	------------------	--------------	------------	-----------------	-------

Tabela 1. Técnicas utilizadas para o imageamento de NPMs

MRI	Magnetismo	Óxido de ferro	Anatômica, Fisiológica e Molecular	Minutos a Horas	>\$300.000
MPI	Magnetismo	Óxido de ferro	Fisiológica, Molecular	Minutos	\$250.000–\$475.000
CT	Radiação (Raios-x)	Au,*(iodo, sulfato de bário)	Anatômica, Fisiológica	Minutos	\$100.000–\$300.000
PET/SPECT	Radiação (Raios- γ)	(^{124}I , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{88}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	Fisiológica, Molecular	Minutos a Horas	>\$300.000
IO	Luz	IR780, QDs, UCNPs, RhodaDOPE	Fisiológica, Molecular	Segundos a Minutos	\$100.000 a \$300.000
US	Ondas Sonoras de alta frequência	Si-NPs, PFC, Au	Anatômica, Fisiológica	Segundos a Minutos	\$50 a \$100.000
Abreviações: Au, ouro; Si, Sílica; PFC, perfluorocarbono; QDs, Quantum Dots; UCNPs, <i>Upconversion Nanoparticles</i> ; ^{124}I , iodo; ^{18}F , flúor; ^{64}Cu ,cobre; ^{89}Zr ,zircônio; ^{88}Y , ítrio; $^{99\text{m}}\text{Tc}$, tecnécio					

1.4.1.1 Imagem Ótica (IO)

Recentemente, a IO atraiu muito interesse e tem sido cada vez mais utilizada para avaliar a biodistribuição de NPs devido a suas vantagens como não invasividade, alta sensibilidade, não utilização de radiação ionizante e por permitir análises em tempo real (Mountz et al., 2012, Key and Leary, 2014). A classe da IO engloba as técnicas que fazem uso de materiais fluorescentes para a realização de imagens. A imagem ótica é baseada na detecção de luz de fótons transmitidos através dos tecidos, considerando que os tecidos não apresentem propriedade de transparência, portanto absorvem energia em determinado comprimento de onda.

A imagem por fluorescência ótica é realizada pela adição de fluoróforos às NPMs e consequente excitação desses determinados materiais utilizando luz externa para que sua emissão seja detectada por uma câmera acoplada. Além de moléculas inorgânicas e os como por exemplo, IR780, isotiocianato de fluoresceína, corantes fluorescentes e os elementos lantanídeos, compreendem também a classe de matérias fluoróforos, algumas moléculas inorgânicas, como a hemoglobina, proteínas bioluminescentes e proteínas fluorescentes (Key and Leary, 2014, Ye and Chen, 2011).

Uma modalidade de IO largamente utilizada baseia-se na imagem de fluorescência de próximo do infravermelho (NIRF), aplicado para imagens *in vivo* em animais. A Figura 2 ilustra imagens NIRF de NPs em ratos. Na figura 2, pode-se observar imagens referentes à biodistribuição de nanopartículas fosfolipídicas associadas com material fluorescente, IR-780, em ratos com tumor cerebral.

Contudo, a imagem ótica por fluorescência *in vivo* possui limitações fundamentais como dispersão de luz, autofluorescência e absorção por tecidos adjacentes, e principalmente apresenta penetração limitada (Shin et al., 2015).

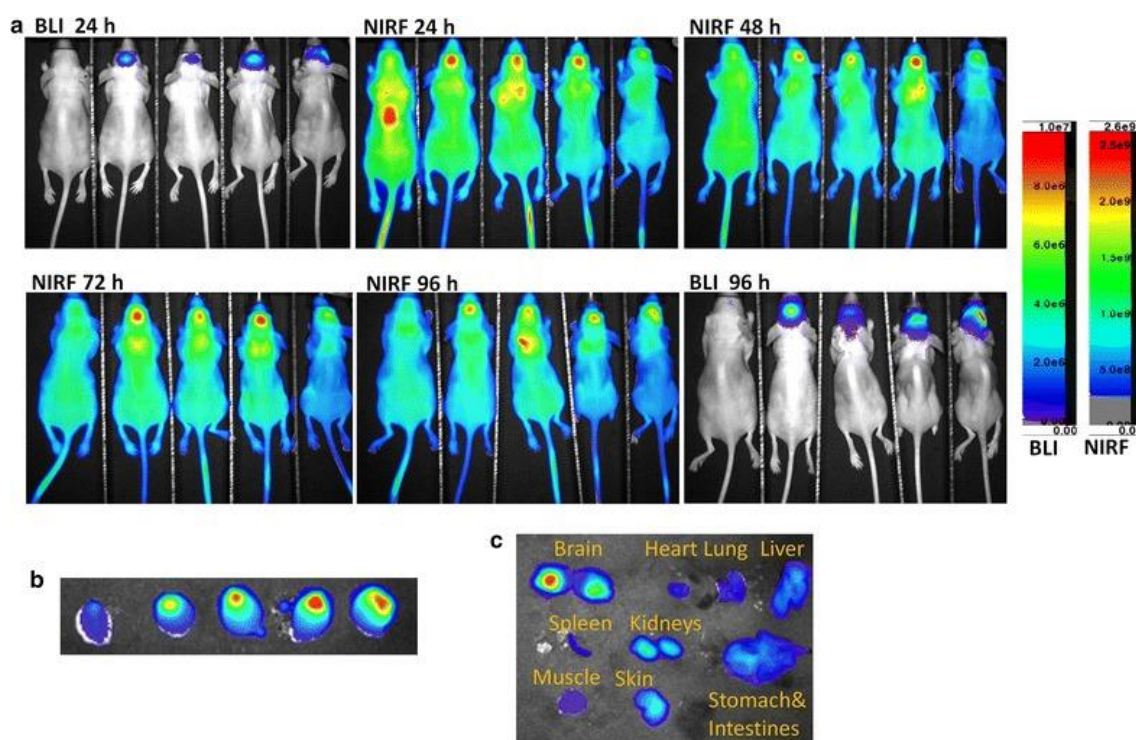


Figura 2. Imagem NIRF *in vivo* de nanopartículas fosfolipídicas com IR780 em ratos com modelo de tumoral cerebral. O crescimento do tumor foi medido pela intensidade do sinal de bioluminescência (BLI). A) Os ratos portadores de tumores receberam nanopartículas fosfolipídicas com IR780 via administração caudal. As imagens de pós-injeção, sequencial BLI e NIRF foram tomadas em cada ponto de tempo. B) Imagem NIRF de cérebros de ratos *ex vivo* após a última imagem de corpo inteiro. C) Imagem NIRF representativa dos órgãos *ex vivo* (cérebro, pulmão, coração, fígado, baço, rins, estômago e intestinos, músculo inferior, pele. Retirado de (Li et al., 2017)

1.4.1.2 Tomografia Computadorizada (TC)

A Tomografia Computadorizada é uma técnica baseada na utilização de feixes de raios X, obtendo sinais em diferentes ângulos que permitem a reconstrução 3-D com a finalidade de visualização de órgãos e tecidos de interesse. É amplamente utilizada como ferramenta de diagnóstico na clínica médica.

Os agentes de contrastes atuais aplicados nos exames de TC são basicamente compostos iodados ou a base de bário, principalmente devido ao fato desses elementos apresentarem alta absorção de raios X. Essa modalidade é usada para a realização de imagens anatômicas com alta resolução a fim de se avaliar perfis de perfusão, angiografia, fluídos extracelulares e espaços vasculares (Mannheim et al., 2016, Ha et al., 2017, Kunjachan et al., 2015). Entretanto, a maior desvantagem ocorre por se fazer uso de radiação ionizante, tornando-se um método invasivo e também de alto custo, além de ser um método não direto de medida (Wunderbaldinger et al., 2002). Os meios de contraste utilizados pela TC também apresentam potencial toxicidade, pois estes agentes de contraste tendem sofrer rápida depuração renal, contribuindo para alta toxicidade nos rins (Key and Leary, 2014, Nune et al., 2009).

Para contornar as devidas falhas, novos complexos que atuem como agentes de contraste são investigados. Associação de iodo ou bário com NPs são projetados com o propósito de se aumentar o tempo de circulação e diminuir a toxicidade envolvida com os meios de contraste utilizados em TC. (Kong et al., 2007) Kim e colaboradores desenvolveram um complexo de NPs de ouro recobertas com iodo e Polietilenoglicol (PEG) com a intenção de propor um efetivo agente de contraste com maior tempo de circulação (Kim et al., 2012). Além disso, NPs de Ouro tem sido utilizadas com a finalidade de se aumentar o contraste, especialmente em exames focados na vascularização. A Figura 3 demonstra um exemplo de aumento de contraste com NPs de Ouro.

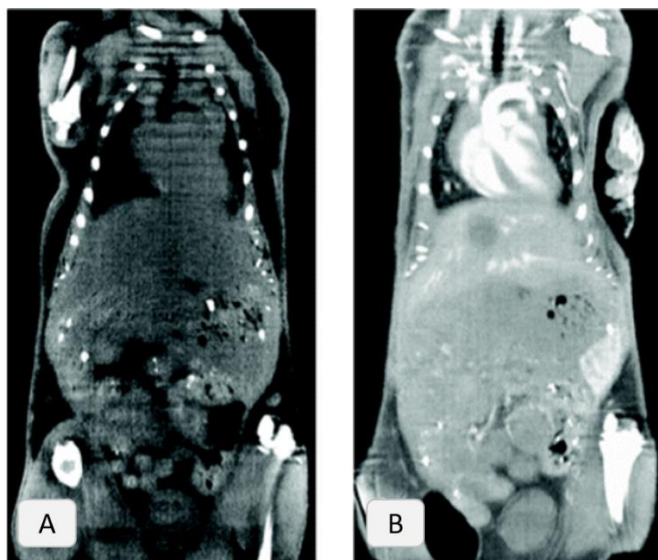


Figura 3. Imagens de Micro-CT em ratos: pré-contraste (a), contraste aprimorado às 6 h após a administrações de AuNP-PEG (b). Retirado (Xi et al., 2012).

1.4.1.3 Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) e Tomografia de Emissão de Fóton Único (SPECT)

Amplamente utilizados para gerar imagens moleculares na clínica visando diagnósticos de doenças, estadiamento de doenças e monitoramento de terapia, aprovado há anos pelo FDA (do inglês - *Food and Drug Administration*), (Cai and Chen, 2007, Li et al., 2004, Gambhir, 2002) o PET é uma modalidade de imagem de medicina nuclear para produzir imagens biológicas funcionais 3-D. Sem a necessidade de excitação externa, a técnica se baseia na detecção e quantificação de pósitrons (Raios- γ) emitidos por radionúclídeos. Esses pósitrons emitidos aniquilam elétrons próximos, gerando assim dois fótons de 511 keV em direções contrárias, que são detectados por detectores posicionado no sistema (Massoud and Gambhir, 2003, Hahn et al., 2011, Devaraj et al., 2009). Posteriormente, os dois fótons são detectados por um cintilador que converte-os em luz.

Como já comentado anteriormente, devido às características intrínsecas das NPs, elas podem interagir com uma série de agentes e moléculas. Nesse sentido, as NPs podem ser funcionalizadas a partir da marcação com radionuclídeos, atuando como uma nova classe de agentes de contraste para imagens fisiológicas e anatômicas através do monitoramento da radiação emitida pelo radionuclídeo acoplado à partícula (Xing et al., 2014, Pham et al., 2017). Em estudo publicado por (Perez-Medina et al., 2015), foi utilizado NPs de dextran radiomarcadas de zircônio (^{89}Zr) como agente de imagem *in vivo* de PET para o imageamento de macrófagos (Figura 4).

Características como alta sensibilidade, profundidade de penetração, ampla gama de radionuclídeos disponíveis, contribuem para o PET ser aplicado para monitorar a farmacocinética e a biodistribuição de NPs.

SPECT é uma técnica presente na clínica muito semelhante ao PET, porém diferencia-se na capacidade de detectar não apenas fotos com energia de 511 keV, mas sim uma maior variedade de energias de fótons e, portanto, pode ser empregada em imagens multiespectrais usando múltiplos radiomarcadores, como por exemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In (Kunjachan et al., 2015, Hahn et al., 2011, Key and Leary, 2014). Em quesitos de sensibilidade, SPECT apresenta menor sensibilidade em relação ao PET, porém destaca-se pois permite a detecção e avaliação de diferentes traçadores e ao mesmo tempo. A Figura 5 apresenta imagens da distribuição de NPs radiomarcadas com ^{111}In 24 horas após a administração intravenosa em camundongos.

Quando, adequadamente, diferentes radionuclídeos são associados as NPs, o rastreamento via SPECT torna-se uma ferramenta interessante para se investigar e

caracterizar diversos parâmetros *in vivo*, como atividade enzimática, perfusão de órgão e biodistribuição.

Recentemente pesquisadores vem utilizando estratégias baseadas em desenvolver NPs multifuncionais com diferentes radiomarcadores para atuar como agentes que se direcionem a tumores e realizem imagens, fornecendo informações bioquímicas (Black et al., 2015, Chrastina and Schnitzer, 2010).

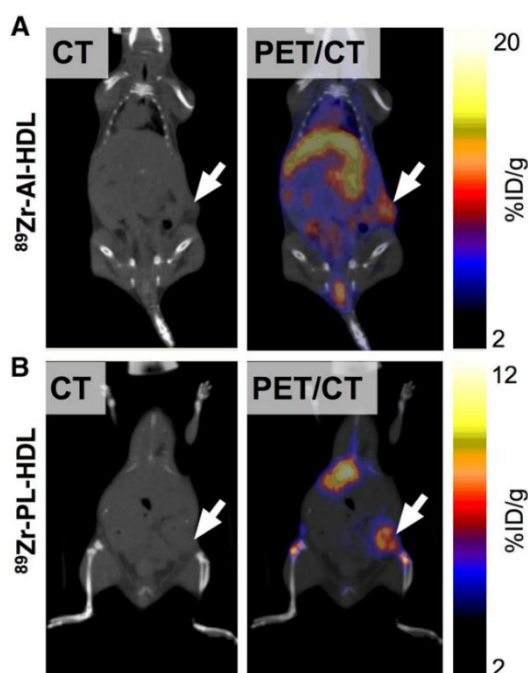


Figura 4. Acúmulo de NPs radiomarcadas em tecidos tumorais pode ser visualizado por imagens de PET *in vivo*. Imagens de TC (esquerda) e associação de PET/CT (direita). A) Imagem de TC e PET de NPs- ^{89}Zr -AI-HDL e B) Imagem de TC e PET de NPs- ^{89}Zr -PL-HDL 24 hs após a infusão. Abreviações: ^{89}Zr , zircônio; AI, apolipoproteína; PL, fosfolípido; HDL, lipoproteína de alta densidade. Retirado de (Perez-Medina et al., 2015)

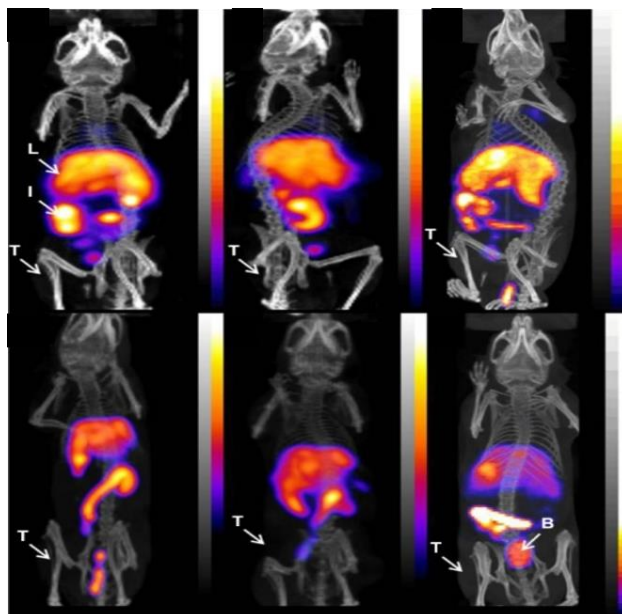


Figura 5. Exemplo de imagem SPECT de NPs radiomarcadas com $^{111}\text{Indio}$. Abreviações: L, Fígado; I, intestino; T, tumor; B, bexiga. Retirado de (Rangger et al., 2013).

1.4.1.4 Ultrassom

Ultrassom (US) é uma técnica de diagnóstico por imagem utilizada para visualizar estruturas internas do corpo (músculos, articulações e vasos), tornando-se útil para identificar motivos e causas de doenças. A modalidade é amplamente utilizada na rotina clínica por ser segura, não invasiva, não ionizante, e fornecer imagens em tempo real (Agrawal et al., 2010, Guo et al., 2018).

O método de ultrassonografia fundamenta-se na interação de ondas de ultrassom e os tecidos. Ondas de ultrassom são ondas mecânicas com frequência acima da faixa de audição humana ($> 20\text{KHz}$).

A imagem de US é baseada no princípio das ondas sonoras que emergem do transdutor oscilante. Quando os pulsos emitidos encontram estruturas internas, ou alterações de densidade provenientes dos diferentes tecidos, aproximadamente 1% da onda é refletida e o restante é refratado (Mura and Couvreur, 2012). A retrodispersão

oriunda da reflexão de determinados tecidos ocorre devido a diferença de impedância dos tecidos biológico.

Transdutores, compostos de materiais piezoelétricos, detectam as ondas acústicas refletidas (eco), que variam em função da reflexão dos tecidos, e transformam essas oscilações mecânicas em sinais elétricos (Fu and Ke, 2016, Padmanabhan et al., 2016, Kunjachan et al., 2015) (Guo et al., 2018).

O sistema de imagem a ser utilizado dependerá do órgão ou tecido que será diagnosticado, pois fatores físicos, como comprimento de onda e frequência, são otimizados com o determinado propósito de melhor diagnóstico do órgão. De modo geral para se realizar uma imagem com resolução de 1 mm é necessário um ultrassom de 1.5 Mhz (Ng et al., 2011). O coeficiente de absorção é outro fator que é decisivo devido ao fato que é proporcional à frequência do US. Frequências entre 2 e 5 MHz são usadas em exames de alta penetração (cardiologia, abdômen, obstétricos)(Chan and Perlas, 2011). Exames com alta penetração e alta resolução operam em frequências até 20 Mhz (mama, tireóide, oftálmicos, do testículo e da periferia vascular) (Chan and Perlas, 2011).

Contudo, o US é limitado por uma baixa resolução, sensibilidade e penetração. Outro ponto desfavorável é que os tecidos moles apresentam baixa ecogenicidade, necessitando de agentes de contraste para melhorar a imagem e distinguir tais tecidos (Mura and Couvreur, 2012). A fim de se contornar tais problemas, agentes de contrastes funcionalizados com NPs estão sendo desenvolvidos. Um exemplo são as NPs de perfluorocarbonetos (PFCNPs), desenvolvidas primeiramente por Lanza e Wicklin et al., 2006, que atraem atenção considerável para aplicações em imagens moleculares direcionadas de entrega de medicamentos (Lanza et al., 2006, Tran et al., 2007). A

figura 6 ilustra como a associação de NPs à agentes de contraste aumenta a resolução e o contraste de imagens.

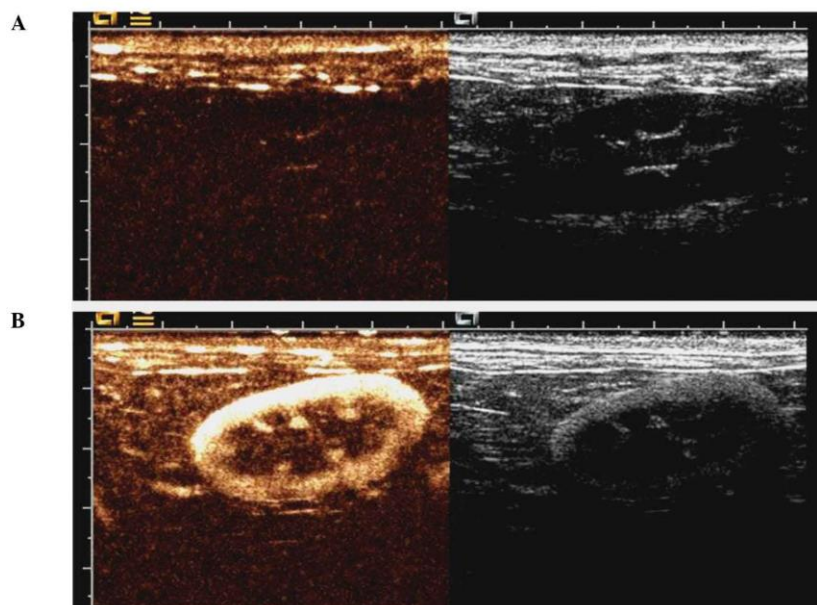


Figura 6. Imagens representativas de contraste e ultrassonografia representativas no rim de coelho A) Pré- e (B) pós-administração de paclitaxel- NPs-PLGA (poli- ácido láctico-co-glicólico) – PEG. Esquerda, modo de contraste; direita, modo convencional. Retirado de (Ma et al., 2015).

1.4.1.5 Imagem por Ressonância Magnética (MRI)

MRI é um método de diagnóstico clínico não invasivo largamente utilizado, capaz de fornecer várias informações no interior do corpo, incluindo excelentes detalhes anatômicos, fisiológicos e até mesmo moleculares (Kircher and Willmann, 2012, Willmann et al., 2008).

A técnica depende do tempo de relaxamento spin-rede e do tempo de relaxamento spin-spin dos prótons presentes nos diferentes tecidos e órgãos, para criar contrastes na

imagem. O contraste é originado através da medição dos processos de relaxamento de prótons de hidrogênio em diferentes situações (Li et al., 2016, Willmann et al., 2008).

A ressonância magnética produz imagens baseadas em contraste gerado em sistemas biológicos medindo os processos de relaxamento de prótons em diferentes ambientes (Key and Leary, 2014). A MRI aplica um campo magnético forte (B_0) que alinha os momentos magnéticos de prótons, os quais preferirá alinhar paralelamente ao campo magnético (menor estado de energia), enquanto o restante alinha-se antiparalelamente (estado de energia mais alto). Em seguida, ao longo da direção do campo magnético (eixo z), magnetização (M_z) é produzida e os prótons rotacionam em torno do eixo z, num processo chamado de precessão, de acordo com determinada frequência, denominada frequência de Larmor (ω_0) (Mao et al., 2016). Durante este período, os prótons precessionam fora de fase. Quando aplica-se perpendicularmente uma radiofrequência ressonante (RF) como um segundo campo magnético (B_1), alguns prótons no estado de energia inferior invertem-se para o estado superior, absorvendo a energia da RF. Além disso, os prótons precessionam sincronizados em fase. Consequentemente, é gerada uma magnetização transversal (M_{xy}) perpendicular ao campo magnético estático (Hahn et al., 2011, Kiselev, 2017). Na remoção do RF, o momento magnético gradualmente relaxa em direção de B_0 com liberação da energia absorvida (Condeelis and Weissleder, 2010). Os processos de relaxamento podem ser medidos pelo eixo z e plano xy nas direções tridimensionais, que são definidas pelo relaxamento longitudinal (T_1) e pelo relaxamento transversal (T_2) (Stephen et al., 2011).

Os tempos de relaxamento são sensíveis aos agentes de contraste presente no local, que alteram as intensidades de sinais, reduzindo os tempos de relaxamento T_1 ou T_2 (Kim et al., 2007). Em relação ao diagnóstico humano atualmente, são amplamente

utilizados como agentes de contrastes positivo ponderado em T_1 , complexos de metais lantanídeos, principalmente o gadolínio (Gd^{3+}) (Caravan, 2006). A adversidade na utilização do Gd^{3+} são os efeitos colaterais como a fibrose sistêmica nefrogênica, devido à alta toxicidade que apresenta. Considerando os fatores acima citados e observando a questão da toxicidade do Gd^{3+} (Abujudeh et al., 2009, Rogosnitzky and Branch, 2016), NPMs podem ser empregadas a fim de aumentar o contraste através da redução de relaxação T_1 ou T_2 aumentando as taxas de relaxação correspondentes, $r_1=1/T_1$ or $r_2=1/T_2$, produzindo sinais hiperintensos e hipointensos, respectivamente, em tempos mais curtos. (Estelrich et al., 2015, Stephen et al., 2011)

Além de ser empregado para diagnóstico de doenças e no monitoramento de terapias, o MRI inclui como aplicabilidades, a realização análises de farmacocinética, biodistribuição e estudos de monitoramento de liberação de drogas. Assim, a ressonância magnética desempenha um papel crescente no diagnóstico clínico (Mulder et al., 2013, Kunjachan et al., 2015).

A utilização de propriedades intrínsecas das MNPs pode ser muito útil no desenvolvimento de agentes de contraste para MRI, e assim cada vez mais são propostas nanoestruturas para esse fim. Além do potencial terapêutico que exibem, as MNPs ainda podem também refinar a sensibilidade do MRI, oferecendo novas perspectivas e possibilidades ainda não vislumbradas. A figura 7 apresenta diferentes cortes de imagens de MRI em que se utilizou NPMs como contraste.

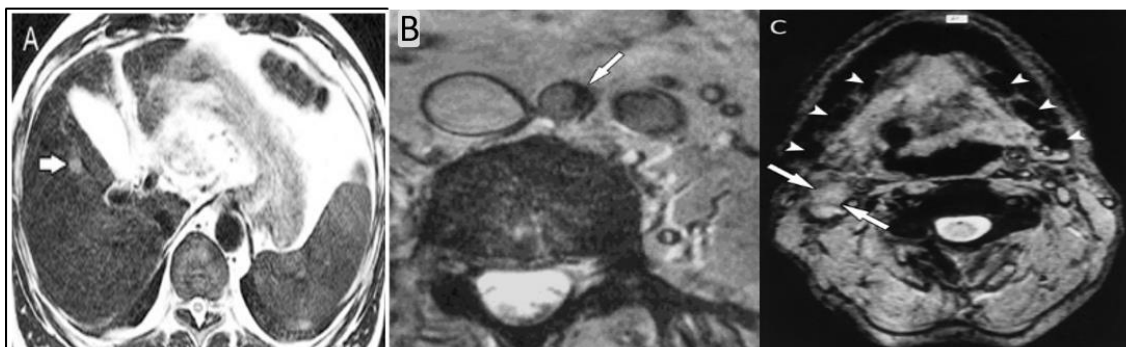


Figura 7. Uso de NPMs para o imageamento do SRE. A) demonstra que os macrófagos do fígado incorporam as NPMs (Kim et al., 2006). B) apresenta imagem de lesões inflamatórias após a infusão de NPMs, é possível observar que a placa aterosclerótica (seta) rica em macrófagos pode ser detectada devido à sua forte diminuição na intensidade do sinal (Schmitz et al., 2001). C) demonstra como as NPMs podem ajudar a diferenciar os linfonodos metastáticos (setas) e saudáveis (cabeças de seta) em pacientes com carcinoma tonsilar (Mack et al., 2002).

1.4.1.6 Magnetic Particle Imaging (MPI)

O MPI é uma técnica de imagem relativamente nova que detecta unicamente NPMs, desenvolvida no Laboratório de Pesquisa da Philips em Hamburgo, na Alemanha. Em 2005 Gleich e Weizenecker publicaram um trabalho no qual apresentavam as primeiras imagens via MPI no qual demonstram todo o potencial desta técnica (Arami et al., 2017, Gleich and Weizenecker, 2005).

Esta técnica destaca-se no campo da nanomedicina pelas vantagens que oferece. A intensidade do sinal que o MPI detecta é diretamente proporcional a concentração de NPMs, sendo que o sistema não apresenta ruídos de fundo pois os tecidos biológicos e os órgãos são diamagnéticos e, portanto, não contribuem para alterações ou distorções na imagem. O MPI também pode gerar imagens baseadas no contraste positivos em tempo real.

Além disso, o MPI não apresenta forte dependência com a homogeneidade do campo magnético, como no caso do MRI, de modo que o custo de produzir e manter o campo magnético é mais baixo. Vale ressaltar que essa técnica não envolve o uso de radiação ionizante (Arami et al., 2017, Du et al., 2013).

NPMs são o principal traçador utilizado pelo MPI por apresentarem comportamento superparamagnético e portanto sua magnetização somente ocorre na presença do campo de excitação. Quando o campo de excitação é nulo, o material superparamagnético não apresenta nenhuma magnetização remanente (Buzug et al., 2012).

A técnica de forma geral ainda está no âmbito da pesquisa e estará comercialmente disponível no futuro (Ferguson et al., 2013). Atualmente, o desenvolvimento de traçadores específicos para o MPI encontra-se em estágios iniciais e se concentram principalmente nos efeitos que o tamanho das nanopartículas causa na sensibilidade e resolução espacial do sistema (Shin et al., 2015).

Contudo é encontrado na literatura resultados promissores. Arami e colaboradores desenvolveram NPMs funcionalizadas para alcançar o tecido canceroso no cérebro de camundongos e avaliaram a capacidade do MPI realizar imagens (Arami et al., 2017).

A figura 8 apresenta uma imagem demonstrando a alta sensibilidade do sistema MPI e o potencial de realizar estudos de biodistribuição *in vivo*. Esta imagem demonstra a alta sensibilidade e contraste de MPI e a capacidade de realizar estudos de biodistribuição *in vivo* a longo prazo sem a perda exponencial de sinal típico em estudos de medicina nuclear.



Figura 8. Imagem MPI representativa mostrando a visualização da biodistribuição de células-tronco marcadas com NPMs após serem administradas via caudal de um rato. À esquerda, imagens realizadas logo após a infusão, a qual é possível observar maior acúmulo no pulmão. À direita, imagens realizadas com 12 dias após a infusão, demonstrando maior acúmulo no fígado e no baço (Tay et al., 2016).

1.5 Biosusceptometria AC (BAC)

Em relação ao PET e ao SPECT, ambas as técnicas demonstram desvantagem similar em relação ao fato de que apenas hospitais e determinados centros de pesquisas tem a possibilidade de manipular isótopos radioativos, o que limita muito o número de pesquisadores que têm a oportunidade de utilizar essas técnicas. Outras inviabilidades são a incerteza nas informações anatômicas, e o uso de radiação ionizante. Além disso, o curto tempo de imagem devido a utilização de radionuclídeos e o custo de compra e instalação de um ciclotron são consideradas grandes limitações (Jadvar and Colletti, 2014, Nahrendorf et al., 2010, Oh et al., 2007). A TC também apresenta a desvantagem por se fazer uso de radiação ionizante, tornando-se um método invasivo e também de

alto custo, além de ser um método não direto de medida (Wunderbaldinger et al., 2002). Além disso, muitas vezes faz-se necessário aumentar a dosagem de agentes de contraste a fim de se verificar diferenças entre os tecidos normais e cancerosos.

Desta forma, técnicas que não façam uso de radiação ionizante, sempre são de grande interesse. Vale ressaltar que essas técnicas, devido aos seus princípios físicos de funcionamento, não são capazes de detectar diretamente NPMs tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Tanto MPI e MRI atuam como métodos diretos de detecção das NPMs, no entanto ambos apresentam limitações. Embora MRI com contraste em T_2 venha sendo aplicado para o rastreamento *in vivo* de NPMs, a técnica não é ideal para a detecção quando as partículas estão presentes em órgãos com grande taxa de captação, como fígado e baço, devido ao processo de saturação que pode ocorrer na intensidade do sinal de T_2 , resultando em imagens sem informações úteis em função do escurecimento (Arami et al., 2015).

Em particular, o MPI ainda é distante de aplicações em humanos devido a limitações física como o FOV (*field of view*) restrito e a complexidades associadas a problemas de segurança (Saritas et al., 2013).

Tendo em vista todo o cenário apresentado, ainda é necessário uma modalidade de imageamento que traga novas perspectivas no estudo de parâmetros relacionados a diversas doenças e disfunções através do uso de NPMS, uma vez que existem inúmeras doenças. A falta de técnicas capazes de interagir com materiais nanoestruturados *in vivo* de maneira minimamente invasiva, com alta resolução temporal e custos acessíveis ainda é um entrave para se estabelecer as NPMs na medicina.

Nesse contexto, a Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) surge de maneira inovadora e como alternativa para a detecção de NPMs *in vivo* e em tempo real. O

sistema BAC é um método biomagnético consolidado e empregado há anos na área de gastroenterologia (Agostinho et al., 2010, Calabresi et al., 2015, Miranda et al., 1992, Miranda et al., 2010, Miranda et al., 1997). Recentemente, quando foi aplicado para detectar e monitorar em tempo real o perfil de biodistribuição dos NPMs apresentou bons resultados (Prospero et al., 2017, Quini et al., 2017a).

A técnica apresenta vantagens sobre diversos sistemas, como: o baixo custo, versatilidade, baixíssima invasividade, portabilidade e ausência de radiação ionizante (Miranda et al., 2010). Além disso, o sistema BAC possibilita avaliações em tempo real, e é uma técnica de detecção direta, isto é, não necessita de outros agentes de marcação nas NPMs, como agentes fluorescentes ou radioativos.

A técnica se baseia em um transformador duplo de fluxo magnético, onde a aproximação de um material magnético do sensor altera a indução de corrente das bobinas de excitação para as de detecção e o desbalanceamento das correntes pode ser medido, adquirido e quantificado. Esta alteração é proporcional à distância entre o material e o sensor e também às características intrínsecas das nanopartículas avaliadas.

Até 2017 o sistema BAC tinha sido aplicado para detectar NPMs, *in vivo* e em tempo real, utilizando apenas um sensor, e os sinais provenientes dos órgãos alvo, perfundidos por partículas, como coração, fígado e rins, eram adquiridos e estudados (Prospero et al., 2017, Quini et al., 2017a, Quini et al., 2015).

O trabalho aqui apresentado é fruto de arranjos geométricos recentes realizados no sistema BAC, no qual foi construído e utilizado um sistema BAC composto por 10 sensores de detecção (sistema Multicanal BAC). Esses sensores foram estrategicamente posicionados e distribuídos de forma a captar o sinal proveniente das NPMs nas cavidades abdominal e torácica de um animal (rato *Wistar*). A partir destes sinais, foi possível, pela primeira vez, formar imagens magnéticas em tempo real da chegada e

saída das NPMs no coração do animal (após administração endovenosa) e sua subsequente chegada e retenção no fígado do animal.

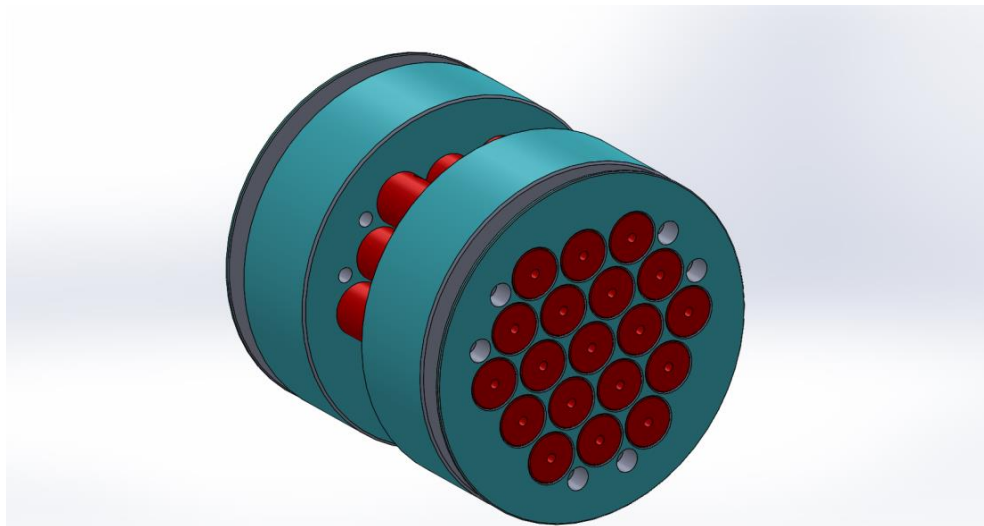


Figura 9. Ilustração do sistema BAC Multicanal utilizado nesse trabalho.

1.6 Farmacocinética

Farmacocinética é definida como o estudo do curso temporal desde a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de drogas. A compreensão dos processos farmacocinéticos das drogas e materiais nanoestruturados, auxiliam perspectivas farmacológicas e também toxicológicas. O termo farmacocinética engloba processos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). A circulação de uma droga pelo corpo pode se mostrar como um processo muito complexo, pois vários outros processos atuam simultaneamente, alterando as concentrações de fármacos nos tecidos (Paxton, 1981, Raghuram and Krishnaswamy, 1992).

Estudos farmacocinéticos avaliam as variações dos níveis de fármaco no corpo em função do tempo, permitindo a sua quantificação para modelamento da farmacocinética do fármaco sob diversas situações (Tillement and Tremblay, 2007). Além disso,

avaliam a concentração do fármaco e seus metabólitos em diferentes órgãos, tecidos, sangue e substâncias excretadas, como bile, urina, suor e saliva.

A farmacocinética clínica é uma vertente que visa utilizar-se de conhecimentos clássicos com o objetivo de otimizar os benefícios do fármaco, como aumentar o tempo de circulação e eficácia, e também diminuir potenciais toxicidades (DiPiro and American Society of Health-System Pharmacists., 2010).

As quatro fases da farmacocinética, o processo de ADME, podem ocorrer simultaneamente e muitas vezes não sucessivamente. Nesse contexto, as drogas e fármacos em geral devem exibir determinadas propriedades farmacocinéticas para se obter a terapia desejada (Turfus et al., 2017). Para isso, precisam apresentar quantidade suficiente para acessar os alvos desejados e produzir efeitos farmacológicos, manter sua concentração em níveis razoáveis por um período de tempo, e excretar o fármaco original e seus metabólitos de acordo com processos previstos e de maneira natural, sem que processos externos, como condições fisiopatológicas, alterem a eliminação (Tillement and Tremblay, 2007).

Considerando as perspectivas mostradas acima, com o propósito de serem utilizadas na medicina, as NPs pode ser relacionadas aos fármacos não pelo efeito terapêutico, mas sim pelos processos farmacocinéticos que também devem realizar, como especificidade pelos locais de intenção e tempo de circulação razoável. Logo, descrever tais processos pode contribuir na seleção de um agente farmacologicamente eficaz que exiba o melhor perfil para uso humano.

Processos farmacocinéticos podem ser representados por sistemas de equações matemáticas, que expressam como é o processo de absorção, trânsito de uma droga dentro dos órgãos, seu metabolismo e sua eliminação. A compreensão das equações e suas respectivas soluções baseadas nos processos fisiológicos, podem auxiliar médicos a

determinarem, com mais cuidado, a dosagem correta para cada paciente, considerando os fatores biológicos individuais (Kester et al., 2012).

1.6.1 Modelos Compartimentais Farmacocinéticos de NPs

Modelos Compartimentais são frequentemente usados para descrever a transferência de uma material em sistemas biológicos. Fundamentalmente, objetivam abrandar processos biológicos complexos, como a evolução temporal da concentração de um fármaco, através de equações matemáticas e estabelecer interpretações simples acerca do problema.

Atualmente, os modelos farmacocinéticos para análise farmacológicas são essenciais, tendo em vista que é inviável mensurar a concentração de qualquer droga na circulação sanguínea não realizando algum método invasivo (Kreuer et al., 2014).

A modelagem matemática se constrói em fatores como: i) a compreensão e avaliação do problema em estudo; ii) a representação matemática realista dos fenômenos importantes; iii) a descoberta de soluções úteis; iv) a interpretação dos resultados matemáticos, baseados na previsão ou simulação realizada pelo modelo. Portanto, para a utilização de um modelo matemático, é necessário o entendimento correto do modelo e a aplicação à fenômenos de interesse, tanto fisiológicos como farmacocinéticos (Durisova and Dedik, 2005).

Assim, modelos farmacocinéticos dinâmicos estão se tornando uma ferramenta que busca maior aplicação na otimização de terapias em geral, baseadas tanto em drogas convencionais como na utilização de materiais nanoestruturados (Ball et al., 2013).

A abordagem físico-matemática pode ajudar a compreender a distribuição e acumulação das NPMs. Os modelos farmacocinéticos empregam equações diferenciais para descrever processos fisiológicos (Al-Jamal et al., 2016, Neubauer et al., 2008a).

Além disso, os parâmetros farmacocinéticos, como taxas de transferência entre determinados órgãos, podem ser estimados e correlacionados com as propriedades de NPMs e perfis fisiológicos, ajustando dados de biodistribuição experimental *in vivo* no modelo matemático (Li et al., 2012).

A construção de modelos farmacocinéticos que contemplem a ação de NPMs num determinado sistema biológico é um processo complexo, pois esses modelos além de compreender os padrões biológicos, devem descrever como a relação de propriedades intrínsecas das NPMS com o sistema, pode alterar o modelo.

Características como tamanho, carga superficial, composição e revestimento são parâmetros que devem ser totalmente visualizados previamente, visando o aperfeiçoamento do modelo farmacocinético. Nesse trabalho, por exemplo, foram utilizadas NPMs com tamanho considerável que não permitem sua excreção renal, uma vez que atualmente é concebido que NPs maiores do que 8 nanômetros, não apresentam excreção renal. (Choi et al., 2007) Atentando-se para esse fato, foi desenvolvido um modelo farmacocinético que melhor descrevia o perfil de captação hepática, considerando que o tamanho e o revestimento utilizado são atrativos para a atuação das células de Kupffer (Roohi et al., 2012, Lartigue et al., 2013).

Apesar do fato de existir inúmeros estudos que investigam a atuação do fígado como uma barreira importante para a administração de medicamentos, os mecanismos para a captação de nanopartículas por esse órgão são mal compreendidos (Tsoi et al., 2016). Ainda, não é totalmente assimilado como cada estrutura do fígado contribui para a retirada e captação das NPMs. Em particular, acredita-se que as condições de vascularização que o fígado apresenta contribuem para o maior acúmulo nesse órgão (Samuelsson et al., 2017).

Esse desafio ao entendimento da atuação hepática frente a NPMs, estimula o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos a fim de auxiliar e sustentar novos fundamentos da absorção de NPMs pelo fígado. Por exemplo, Tsoi e colaboradores desenvolveram um modelo matemático para descrever o fluxo sanguíneo no fígado e a probabilidade de sequestro de nanopartículas (Tsoi et al., 2016).

Os modelos farmacocinéticos compartimentais ainda podem ser classificados em linear e não-linear.

1.6.1.1 Modelo de Compartimento Linear

Os modelos lineares são assim classificados pois respeitam a cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de eliminação é proporcional à quantidade do fármaco presente. Nesses modelos, existe uma relação proporcional entre a massa presente no compartimento e a taxa de eliminação ou a taxa de transferência entre os compartimentos (Wagner, 1981). Assim, se é grande a quantidade de medicamento no organismo também é, ou será, alta a velocidade de eliminação. Por outro lado, a eliminação diminuirá proporcionalmente com a redução da quantidade ou concentração.

Ainda em sistema lineares, a transferência entre os compartimentos é considerada linear e essa estimativa é representada por equações diferenciais de primeira ordem.

Modelos lineares devem se basear em drogas que apresentem esse perfil linear. Compostos são considerados drogas com farmacocinética linear quando a meia-vida independe da concentração, ou seja, quando a depuração é independente da dose, e quando a depuração é independente da administração de doses múltiplas. Matematicamente um sistema linear farmacocinético é descrito pela equação 1:

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (1)$$

A equação demonstra que a taxa de transferência da concentração é dependente apenas da concentração atual. A meia-vida permanecerá constante, não implicando quão alta seja a concentração (Kufe et al., 2003).

Entretanto, um parâmetro farmacocinético aplicado para se avaliar a linearidade de determinada droga é a área sob a curva (AUC). AUC, representa a biodisponibilidade do fármaco ao longo do tempo e é um parâmetro importante para as análises farmacocinética e farmacodinâmica (Benet and Zia-Amirhosseini, 1995). Uma implicação de sistemas lineares é que a AUC, diferentemente dos outros parâmetros farmacocinéticos, é proporcional (linear) a dose aplicada (Kufe et al., 2003).

As soluções de modelos lineares são obtidas na forma analítica, sendo que muitas vezes são utilizados os *softwares* adequados.

Um método muito utilizado para a resolução de sistemas lineares de primeira ordem é a Transformada de Laplace de uma função $LF(t)$ e a transformada inversa L^{-1} (Hermann, 2017). As transformadas possibilitam que as equações diferenciais acerca da transferência da droga, sejam operadas facilmente a partir de técnicas algébricas convencionais (DeVane, 1983). Quando empregada, a transformada de Laplace atua alterando o domínio do contexto, do tempo t para do espaço s . Em seguida, através da transformada inversa, retorna para o domínio do tempo t , o qual é o objetivo do modelo farmacocinético (Gallo-Neto, 2012).

1.6.1.2 Modelo de Compartimento Não-Linear

Diferentemente dos sistemas lineares, nos quais os parâmetros farmacocinéticos não são alterados de acordo com o aumento da dose, os sistemas não-lineares são submetidos a uma cinética não linear, ou seja, os parâmetros farmacocinéticos são

alterados quanto maior for a dose administrada (Shargel, 2012). Esses parâmetros cinéticos podem ser a depuração, o volume de distribuição e a meia-vida. Os modelos não-lineares são aplicados para drogas ou fármacos que são suscetíveis à saturação em uma alta concentração de fármaco (Mehvar, 2001). O perfil não-linear é também denominado como farmacocinética dependente da dose.

Um fármaco possui farmacocinética não-linear quando alterações na dosagem, tanto para única ou múltiplas doses, refletem em mudanças não proporcionais em suas concentrações na circulação sanguínea (Santos, 2004).

O comportamento não-linear normalmente é originado por processos relacionados à absorção, distribuição, metabolização e excreção, observando que esses processos geralmente abrangem necessidade de enzimas ou carreadores específicos. O perfil não-linear ocorre porque um ou mais dos processos farmacocinéticos do fármaco são influenciados por ações que não envolvam apenas a cinética de primeira ordem. Desse modo é válido considerar que esses processos não são descritos pela simples cinética de primeira ordem (Mehvar, 2001).

Algumas drogas em níveis terapêuticos tendem a se desviar do perfil linear. De maneira geral, a saturação parcial ou total de alguma importante via metabólica, como enzimas responsáveis pela eliminação sistêmica, contribui para posterior depuração reduzida. Portanto, fármacos que apresentam esse perfil não-linear possuem eliminação não regida por cinética de primeira ordem, ou seja, a meia-vida é maior quanto maior for a dose e a AUC não é proporcional à dose (Ludden, 1991, Santos, 2004).

Como uma série de agentes antineoplásicos apresentam comportamento farmacocinéticos não linear, os modelos farmacocinéticos nesse cenário são considerados ferramentas valiosas na compressão dos processos fisiológicos desses fármacos. Por exemplo, o Fluorouracil (5-FU) é um fármaco muito utilizado como

inibidor de crescimento de células cancerígenas. Em estudo publicado por Schaaf e colaboradores (Schaaf et al., 1987), o perfil não-linear do anitineoplásico é observado quando se administra o dobro da dose, resultando em um aumento não-linear de 135% na AUC. Outro exemplo de fármaco com cinética não-linear é a amoxicilina (Paintaud et al., 1992). A biodisponibilidade da amoxicilina é diminuída com o aumento proporcional da dose administrada (Paintaud et al., 1992). Em particular à distribuição e ligação de proteínas transportadoras à disopiramida, fármaco do grupo dos antiarrítmicos utilizados no tratamento das arritmias cardíacas, é um processo que pode ocorrer saturação (Aso et al., 2001). Em relação a excreção renal, o processo de depuração do agente antibiótico dicloxacilina é diminuído com o aumento da dose (Yu et al., 2017).

Sistemas não lineares são complexos e diferentemente dos modelos lineares, a solução a partir dos ajustes não permite que as equações sejam resolvidas analiticamente, tornando-se necessários o uso de métodos numéricos.

2. Referências

- ABDEL-MISIH, S. R. & BLOOMSTON, M. 2010. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90, 643-53.
- ABUJUDEH, H. H., KAEWLAI, R., KAGAN, A., CHIBNIK, L. B., NAZARIAN, R. M., HIGH, W. A. & KAY, J. 2009. Nephrogenic systemic fibrosis after gadopentetate dimeglumine exposure: case series of 36 patients. *Radiology*, 253, 81-9.
- AGOSTINHO, M., AMERICO, M. F., MARQUES, R. G., ZANDONA, E. A., STELZER, M., CORA, L. A., ANDREIS, U., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2010. AC Biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2010, 5740-3.
- AL-JAMAL, K. T., BAI, J., WANG, J. T., PROTTI, A., SOUTHERN, P., BOGART, L., HEIDARI, H., LI, X., CAKEBREAD, A., ASKER, D., AL-JAMAL, W. T., SHAH, A., BALS, S., SOSABOWSKI, J. & PANKHURST, Q. A. 2016. Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans. *Nano Lett*, 16, 5652-60.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L. K. & FAROKHZAD, O. C. 2008. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5, 505-515.
- ALMEIDA, J. P., CHEN, A. L., FOSTER, A. & DREZEK, R. 2011. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 6, 815-35.

- ARAMI, H., KHANDHAR, A., LIGGITT, D. & KRISHNAN, K. M. 2015. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*, 44, 8576-607.
- ARAMI, H., TEEMAN, E., TROKSA, A., BRADSHAW, H., SAATCHI, K., TOMITAKA, A., GAMBHIR, S. S., HAFELI, U. O., LIGGITT, D. & KRISHNAN, K. M. 2017. Tomographic magnetic particle imaging of cancer targeted nanoparticles. *Nanoscale*, 9, 18723-18730.
- ASO, R., OHASHI, K., KATOH, T. & OGATA, H. 2001. Population pharmacokinetics, protein binding and antiarrhythmic effects of disopyramide enantiomers in arrhythmic patients. *Int J Clin Pharmacol Res*, 21, 137-46.
- BALL, K., BOUZOM, F., SCHERRMANN, J. M., WALTHER, B. & DECLEVES, X. 2013. Physiologically based pharmacokinetic modelling of drug penetration across the blood-brain barrier--towards a mechanistic IVIVE-based approach. *AAPS J*, 15, 913-32.
- BARBOSA, M. V., MONTEIRO, L. O., CARNEIRO, G., MALAGUTTI, A. R., VILELA, J. M., ANDRADE, M. S., OLIVEIRA, M. C., CARVALHO-JUNIOR, A. D. & LEITE, E. A. 2015. Experimental design of a liposomal lipid system: A potential strategy for paclitaxel-based breast cancer treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 136, 553-61.
- BENET, L. Z. & ZIA-AMIRHOSSEINI, P. 1995. Basic principles of pharmacokinetics. *Toxicol Pathol*, 23, 115-23.
- BERTRAND, N. & LEROUX, J. C. 2012. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. *J Control Release*, 161, 152-63.
- BHATIA, S. N., UNDERHILL, G. H., ZARET, K. S. & FOX, I. J. 2014. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med*, 6, 245sr2.
- BLACK, K. C., AKERS, W. J., SUDLOW, G., XU, B., LAFOREST, R. & ACHILEFU, S. 2015. Dual-radiolabeled nanoparticle SPECT probes for bioimaging. *Nanoscale*, 7, 440-4.
- CALABRESI, M. F., QUINI, C. C., MATOS, J. F., MORETTO, G. M., AMERICO, M. F., GRACA, J. R., SANTOS, A. A., OLIVEIRA, R. B., PINA, D. R. & MIRANDA, J. R. 2015. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study. *Neurogastroenterol Motil*, 27, 1613-20.
- CARAVAN, P. 2006. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev*, 35, 512-23.
- CHAN, V. & PERLAS, A. 2011. *Basics of Ultrasound Imaging*.
- CHAPMAN, S., DOBROVOLSKAIA, M., FARAHANI, K., GOODWIN, A., JOSHI, A., LEE, H., MEADE, T., POMPER, M., PTAK, K., RAO, J., SINGH, R., SRIDHAR, S., STERN, S., WANG, A., WEAVER, J. B., WOLOSCHAK, G. & YANG, L. 2013. Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. *Nano Today*, 8, 454-460.
- CHOI, H. S., LIU, W., MISRA, P., TANAKA, E., ZIMMER, J. P., IPE, B. I., BAWENDI, M. G. & FRANGIONI, J. V. 2007. Renal Clearance of Nanoparticles. *Nature biotechnology*, 25, 1165-1170.
- CHRASTINA, A. & SCHNITZER, J. E. 2010. Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging. *Int J Nanomedicine*, 5, 653-9.
- COLE, A. J., DAVID, A. E., WANG, J., GALBAN, C. J. & YANG, V. C. 2011. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 6291-301.
- CONDEELIS, J. & WEISSLEDER, R. 2010. In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003848.
- CROMER BERMAN, S. M., WALCZAK, P. & BULTE, J. W. M. 2011. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 3, 343-355.
- DEVANE, C. L. 1983. Pharmacokinetics (2nd edn, revised and expanded), M. Gibaldi and D. Perrier (Vol. 15 of Drugs and the pharmaceutical sciences), Marcel Dekker, New York, 1982. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 4, 201-201.

- DIPIRO, J. T. & AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. 2010. *Concepts in clinical pharmacokinetics*, Bethesda, MD, American Society of Health-System Pharmacists.
- DURISOVA, M. & DEDIK, L. 2005. New mathematical methods in pharmacokinetic modeling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96, 335-42.
- EILS, R. & ATHALE, C. 2003. Computational imaging in cell biology. *J Cell Biol*, 161, 477-81.
- ESTELRICH, J., SANCHEZ-MARTIN, M. J. & BUSQUETS, M. A. 2015. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*, 10, 1727-41.
- FERGUSON, R. M., KHANDHAR, A. P., ARAMI, H., HUA, L., HOVORKA, O. & KRISHNAN, K. M. 2013. Tailoring the magnetic and pharmacokinetic properties of iron oxide magnetic particle imaging tracers. *Biomed Tech (Berl)*, 58, 493-507.
- FERRARI, M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 5, 161-71.
- GALE, E. M., ATANASOVA, I. P., BLASI, F., AY, I. & CARAVAN, P. 2015. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J Am Chem Soc*, 137, 15548-57.
- GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R. & DELIE, F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 1-9.
- GUSTAFSON, H. H., HOLT-CASPER, D., GRAINGER, D. W. & GHANDEHARI, H. 2015. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*, 10, 487-510.
- HAHN, M. A., SINGH, A. K., SHARMA, P., BROWN, S. C. & MOUDGIL, B. M. 2011. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*, 399, 3-27.
- HERMANN, T. W. 2017. *Application of Laplace transforms to a pharmacokinetic open two-compartment body model*.
- HERRNBERGER, L., HENNIG, R., KREMER, W., HELLERBRAND, C., GOEPFERICH, A., KALBITZER, H. R. & TAMM, E. R. 2014. Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS One*, 9, e115005.
- JAMES, M. L. & GAMBHIR, S. S. 2012. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*, 92, 897-965.
- KESTER, M., KARPA, K. D. & VRANA, K. E. 2012. 1 - Pharmacokinetics. *Elsevier's Integrated Review Pharmacology (Second Edition) (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- KEY, J. & LEARY, J. F. 2014. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, 9, 711-26.
- KHERLOPIAN, A. R., SONG, T., DUAN, Q., NEIMARK, M. A., PO, M. J., GOHAGAN, J. K. & LAINE, A. F. 2008. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst Biol*, 2, 74.
- KIM, J.-H., PARK, K., NAM, H. Y., LEE, S., KIM, K. & KWON, I. C. 2007. Polymers for bioimaging. *Progress in Polymer Science*, 32, 1031-1053.
- KIM, Y. K., KWAK, H. S., KIM, C. S., CHUNG, G. H., HAN, Y. M. & LEE, J. M. 2006. Hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: comparison of SPIO-enhanced MR imaging and 16-detector row CT. *Radiology*, 238, 531-41.
- KIRCHER, M. F. & WILLMANN, J. K. 2012. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. part I. principles. *Radiology*, 263, 633-43.
- KISELEV, V. 2017. *Fundamentals of diffusion MRI physics*.
- KOO, H., HUH, M. S., SUN, I. C., YUK, S. H., CHOI, K., KIM, K. & KWON, I. C. 2011. In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc Chem Res*, 44, 1018-28.
- KREUER, S., HAUSCHILD, A., FINK, T., BAUMBACH, J. I., MADDULA, S. & VOLK, T. 2014. Two different approaches for pharmacokinetic modeling of exhaled drug concentrations. *Sci Rep*, 4, 5423.
- KUFE, D., E POLLOCK, R., WEICHSELBAUM, R., BAST, R., S GANSLER, T., HOLLAND, J. & FREI, E. 2003. *Cancer Medicine, 6th Edition*.

- KUMAR, C. S. & MOHAMMAD, F. 2011. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 789-808.
- KUNJACHAN, S., EHLING, J., STORM, G., KIESSLING, F. & LAMMERS, T. 2015. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem Rev*, 115, 10907-37.
- LANZA, G. M., WINTER, P. M., CARUTHERS, S. D., HUGHES, M. S., CYRUS, T., MARSH, J. N., NEUBAUER, A. M., PARTLOW, K. C. & WICKLINE, S. A. 2006. Nanomedicine opportunities for cardiovascular disease with perfluorocarbon nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 1, 321-9.
- LARTIGUE, L., ALLOYEAU, D., KOLOSNAJ-TABI, J., JAVED, Y., GUARDIA, P., RIEDINGER, A., PECHOUX, C., PELLEGRINO, T., WILHELM, C. & GAZEAU, F. 2013. Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution in situ monitoring. *ACS Nano*, 7, 3939-52.
- LI, M., PANAGI, Z., AVGOUSTAKIS, K. & REINEKE, J. 2012. Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content. *Int J Nanomedicine*, 7, 1345-56.
- LI, S., JOHNSON, J., PECK, A. & XIE, Q. 2017. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. *J Transl Med*, 15, 18.
- LI, X., ZHANG, X. N., LI, X. D. & CHANG, J. 2016. Multimodality imaging in nanomedicine and nanotheranostics. *Cancer Biol Med*, 13, 339-348.
- LUDDEN, T. M. 1991. Nonlinear pharmacokinetics: clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*, 20, 429-46.
- MA, J., XING, L. X., SHEN, M., LI, F., ZHU, M. J., JIN, L. F., LI, Z., GAO, F., SU, Y., DUAN, Y. R. & DU, L. F. 2015. Ultrasound contrast-enhanced imaging and in vitro antitumor effect of paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid)-monomethoxypoly (ethylene glycol) nanocapsules with ultrasound-targeted microbubble destruction. *Mol Med Rep*, 11, 2413-20.
- MACK, M. G., BALZER, J. O., STRAUB, R., EICHLER, K. & VOGL, T. J. 2002. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes. *Radiology*, 222, 239-44.
- MAHMOUDI, M., SANT, S., WANG, B., LAURENT, S. & SEN, T. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 24-46.
- MAO, X., XU, J. & CUI, H. 2016. Functional nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 8, 814-841.
- MATHIASSEN, A. B. & KASTRUP, J. 2013. Non-invasive in-vivo imaging of stem cells after transplantation in cardiovascular tissue. *Theranostics*, 3, 561-72.
- MEDINA, C., SANTOS-MARTINEZ, M. J., RADOMSKI, A., CORRIGAN, O. I. & RADOMSKI, M. W. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150, 552-558.
- MEHVAR, R. 2001. *Principles of Nonlinear Pharmacokinetics*.
- MIRANDA, J. R., BAFFA, O., DE OLIVEIRA, R. B. & MATSUDA, N. M. 1992. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Med Phys*, 19, 445-8.
- MIRANDA, J. R., CORA, L. A., AMERICO, M. F. & ROMEIRO, F. G. 2010. AC biosusceptometry technique to evaluate the gastrointestinal transit of pellets under influence of prandial state. *J Pharm Sci*, 99, 317-24.
- MIRANDA, J. R., OLIVEIRA, R. B., SOUSA, P. L., BRAGA, F. J. & BAFFA, O. 1997. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. *Phys Med Biol*, 42, 1791-9.
- MISHRA, N., YADAV, N. P., RAI, V. K., SINHA, P., YADAV, K. S., JAIN, S. & ARORA, S. 2013. Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. *Biomed Res Int*, 2013, 382184.

- MOORE, A., MARECOS, E., BOGDANOV, A., JR. & WEISSLEDER, R. 2000. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*, 214, 568-74.
- MOUNTZ, J. M., ALAVI, A. & MOUNTZ, J. D. 2012. Emerging optical and nuclear medicine imaging methods in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 8, 719-28.
- MULDER, W. J., MCMAHON, M. T. & NICOLAY, K. 2013. The evolution of MRI probes: from the initial development to state-of-the-art applications. *NMR Biomed*, 26, 725-7.
- MURA, S. & COUVREUR, P. 2012. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 1394-416.
- NEUBAUER, A. M., SIM, H., WINTER, P. M., CARUTHERS, S. D., WILLIAMS, T. A., ROBERTSON, J. D., SEPT, D., LANZA, G. M. & WICKLINE, S. A. 2008. Nanoparticle pharmacokinetic profiling in vivo using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 60, 1353-61.
- NG, E., TAN, J. H., ACHARYA, U. R. & SURI, J. 2011. *Human Eye Imaging and Modeling*.
- NIE, S. 2010. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 523-8.
- PAINTAUD, G., ALVAN, G., DAHL, M. L., GRAHNEN, A., SJOVALL, J. & SVENSSON, J. O. 1992. Nonlinearity of amoxicillin absorption kinetics in human. *Eur J Clin Pharmacol*, 43, 283-8.
- PARK, J. K., UTSUMI, T., SEO, Y. E., DENG, Y., SATOH, A., SALTZMAN, W. M. & IWAKIRI, Y. 2016. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine*, 12, 1365-74.
- PAXTON, J. W. 1981. Elementary pharmacokinetics in clinical practice 2: Basic concepts of drug pharmacokinetics. *N Z Med J*, 94, 342-5.
- PEREZ-MEDINA, C., TANG, J., ABDEL-ATTI, D., HOGSTAD, B., MERAD, M., FISHER, E. A., FAYAD, Z. A., LEWIS, J. S., MULDER, W. J. & REINER, T. 2015. PET Imaging of Tumor-Associated Macrophages with ⁸⁹Zr-Labeled High-Density Lipoprotein Nanoparticles. *J Nucl Med*, 56, 1272-7.
- PROSPERO, A. G., QUINI, C. C., BAKUZIS, A. F., FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P., MORETTO, G. M., MELLO, F. P., CALABRESI, M. F., MATOS, R. V., ZANDONA, E. A., ZUFELATO, N., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2017. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *J Nanobiotechnology*, 15, 22.
- PURUSHOTHAM, S. & RAMANUJAN, R. V. 2010. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater*, 6, 502-10.
- QUINI, C. C., MATOS, J. F., PRÓSPERO, A. G., CALABRESI, M. F. F., ZUFELATO, N., BAKUZIS, A. F., BAFFA, O. & MIRANDA, J. R. A. 2015. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 2-6.
- QUINI, C. C., PROSPERO, A. G., CALABRESI, M. F. F., MORETTO, G. M., ZUFELATO, N., KRISHNAN, S., PINA, D. R., OLIVEIRA, R. B., BAFFA, O., BAKUZIS, A. F. & MIRANDA, J. R. A. 2017. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine*, 13, 1519-1529.
- RACANELLI, V. & REHERMANN, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43, S54-62.
- RAGHURAM, T. C. & KRISHNASWAMY, K. 1992. Basic concepts of clinical pharmacokinetics. *J Assoc Physicians India*, 40, 29-35.
- RANGGER, C., HELBOK, A., SOSABOWSKI, J., KREMSER, C., KOEHLER, G., PRASSL, R., ANDREAE, F., VIRGOLINI, I. J., VON GUGGENBERG, E. & DECRISTOFORO, C. 2013. Tumor targeting and imaging with dual-peptide conjugated multifunctional liposomal nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8, 4659-71.
- ROGOSNITZKY, M. & BRANCH, S. 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals*, 29, 365-76.

- ROOHI, F., LOHRKE, J., IDE, A., SCHUTZ, G. & DASSLER, K. 2012. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 4447-58.
- SAITO, M., MATSUURA, T., NAGATSUMA, K., TANAKA, K., MAHASHI, H., SHIMIZU, K., HATABA, Y., KATO, F., KASHIMORI, I., TAJIRI, H. & BRAET, F. 2007. The functional interrelationship between gap junctions and fenestrae in endothelial cells of the liver organoid. *J Membr Biol*, 217, 115-21.
- SAMUELSSON, E., SHEN, H., BLANCO, E., FERRARI, M. & WOLFRAM, J. 2017. Contribution of Kupffer cells to liposome accumulation in the liver. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 158, 356-362.
- SAPSFORD, K. E., ALGAR, W. R., BERTI, L., GEMMILL, K. B., CASEY, B. J., OH, E., STEWART, M. H. & MEDINTZ, I. L. 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev*, 113, 1904-2074.
- SARITAS, E. U., GOODWILL, P. W., CROFT, L. R., KONKLE, J. J., LU, K., ZHENG, B. & CONOLLY, S. M. 2013. Magnetic particle imaging (MPI) for NMR and MRI researchers. *J Magn Reson*, 229, 116-26.
- SCHAAF, L. J., DOBBS, B. R., EDWARDS, I. R. & PERRIER, D. G. 1987. Nonlinear pharmacokinetic characteristics of 5-fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 32, 411-8.
- SCHMITZ, S. A., TAUPITZ, M., WAGNER, S., WOLF, K. J., BEYERSDORFF, D. & HAMM, B. 2001. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging*, 14, 355-61.
- SHARGEL, L. 2012. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, New York, McGraw-Hill.
- SHIN, T. H., CHOI, Y., KIM, S. & CHEON, J. 2015. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem Soc Rev*, 44, 4501-16.
- SIMPSON, G. R., RELPH, K., HARRINGTON, K., MELCHER, A. & PANDHA, H. 2016. Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. *Oncolytic Virother*, 5, 1-13.
- SINGH, A. & SAHOO, S. K. 2014. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug Discov Today*, 19, 474-81.
- STEPHEN, Z. R., KIEVIT, F. M. & ZHANG, M. 2011. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Materials today (Kidlington, England)*, 14, 330-338.
- TAY, Z. W., GOODWILL, P. W., HENSLEY, D. W., TAYLOR, L. A., ZHENG, B. & CONOLLY, S. M. 2016. A High-Throughput, Arbitrary-Waveform, MPI Spectrometer and Relaxometer for Comprehensive Magnetic Particle Optimization and Characterization. *Scientific Reports*, 6, 34180.
- TILLEMENT, J. P. & TREMBLAY, D. 2007. 5.02 - Clinical Pharmacokinetic Criteria for Drug Research. In: TAYLOR, J. B. & TRIGGLE, D. J. (eds.) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier.
- TRAN, T. D., CARUTHERS, S. D., HUGHES, M., MARSH, J. N., CYRUS, T., WINTER, P. M., NEUBAUER, A. M., WICKLINE, S. A. & LANZA, G. M. 2007. Clinical applications of perfluorocarbon nanoparticles for molecular imaging and targeted therapeutics. *Int J Nanomedicine*, 2, 515-26.
- TSOI, K. M., MACPARLAND, S. A., MA, X. Z., SPETZLER, V. N., ECHEVERRI, J., OUYANG, B., FADEL, S. M., SYKES, E. A., GOLDARACENA, N., KATHS, J. M., CONNEELY, J. B., ALMAN, B. A., SELZNER, M., OSTROWSKI, M. A., ADEYI, O. A., ZILMAN, A., MCGILVRAY, I. D. & CHAN, W. C. 2016. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nat Mater*, 15, 1212-1221.
- TURFUS, S. C., DELGODA, R., PICKING, D. & GURLEY, B. J. 2017. Chapter 25 - Pharmacokinetics. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press.

- ULBRICH, K., HOLA, K., SUBR, V., BAKANDRITSOS, A., TUCEK, J. & ZBORIL, R. 2016. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem Rev*, 116, 5338-431.
- VUGMEYSTER, Y., XU, X., THEIL, F.-P., KHAWLI, L. A. & LEACH, M. W. 2012. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3, 73-92.
- WAGNER, J. G. 1981. History of pharmacokinetics. *Pharmacol Ther*, 12, 537-62.
- WILLMANN, J. K., VAN BRUGGEN, N., DINKELBORG, L. M. & GAMBHIR, S. S. 2008. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 591-607.
- XI, D., DONG, S., MENG, X., LU, Q., MENG, L. & YE, J. 2012. Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents. *RSC Advances*, 2, 12515-12524.
- YE, Y. & CHEN, X. 2011. Integrin targeting for tumor optical imaging. *Theranostics*, 1, 102-26.
- YU, W., JI, J., XIAO, T., YING, C., FANG, J., SHEN, P. & XIAO, Y. 2017. Determining optimal dosing regimen of oral administration of dicloxacillin using Monte Carlo simulation. *Drug Des Devel Ther*, 11, 1951-1956.
- ZHEN CHENG, X. Y., XILIN SUN, BAOZHONG SHEN, SANJIV SAM GAMBHIR 2016. Tumor Molecular Imaging with Nanoparticles. *Engineering*, 2, 132-140.

Capítulo II – Artigo Científico

Multichannel AC Biosusceptometry system to access *in vivo* pharmacokinetic profiles of magnetic nanoparticles by images

Guilherme A. Soares ^a, André G. Próspero ^a, Marcos F. F. Calabresi^a, Diego S. Rodrigues ^b, Caio C. Quini ^a, Ronaldo R.V Matos ^a, Leonardo A. Pinto ^a, Ailton A. Sousa-Junior ^c, Andris F. Bakuzis ^c, Paulo F.A. Mancera ^b, Jose R.A. Miranda ^a

^a Laboratório de Biomagnetismo, Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^c Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

ABSTRACT

We report the development of a new technique to evaluate *in vivo* biodistribution of magnetic nanoparticles (MNPs). The Multichannel AC Biosusceptometry System (ACB-MC) allowed real-time assessment of magnetic nanoparticles (MNPs) in both bloodstream clearance and liver accumulation. The liver is a complex network of inter-related cells responsible for the MNP's uptake. Thus, from the ACB-MS acquired images, we propose a mathematical approach to help to understand distribution and accumulation pharmacokinetics of MNPs. The ACB-MS showed great temporal resolution to detect and monitor MNPs, providing sequential images over the particles biodistribution. Utilizing the ACB-MS instrument, we accessed regions corresponding to heart and liver, and we found the MNP's transfer rates between bloodstream and liver. The pharmacokinetic model presented strong correlation with the experimental data, suggesting that the ACB-MS may be a valuable and accessible imaging device to access *in vivo* and real-time pharmacokinetic features of MNPs.

Magnetic Nanoparticles

Ac Biosusceptometry

Pharmacokinetic model

Magnetic Imaging

BACKGROUND

Nanoparticles are structures, usually ranging from 1 to 100 nm, often composed by a great number of materials. Magnetic nanoparticles (MNPs) are a class of nanoparticles that attracts a significant interest, specially for biomedical applications, due to their theranostic potential (Shubayev et al., 2009, Frimpong and Hilt, 2010), combining therapeutic and diagnostic properties (Ozdemir et al., 2006).

MNPs dispersed in aqueous solution allows for bloodstream or tissue injection and, thus can interact with an external magnetic field, providing anatomical and physiological information (Dutz et al., 2015, Veiseh et al., 2010). In biomedical *in vitro* applications, they can be used for magnetic separation of cells or molecules (Bullivant et al., 2013). On regards to *in vivo* applications, they can be employed to both therapeutic, as a magnetic hyperthermia or drug delivery agents (Bakuzis et al., 2013), and to diagnostic applications, as biomarkers and imaging contrast agent or magnetic tracer (Tosi et al., 2011).

Preclinical study models are necessary to characterize patterns of distribution and accumulation in different regions of the body. This allows us to better understand the intereaction between nanoparticles and specific organs before any application in humans (Tosi et al., 2011, Dobrovolskaia et al., 2008). It is of paramount importance the understanding of the kinetics of biodistribution profile, how these materials are distributed within and further eliminated from the body (Wahajuddin and Arora, 2012).

Currently, the detection and monitoring of MNPs are performed by several techniques. The most extensively applied techniques are based on *ex vivo* samples (either by biopsy or by tissue processing after sacrificing the animals). However, such approachoes only enable uncontinuous assessment of the MNPs pharmacokinetics (Lacava et al., 2002). As for *in vivo* studies,

accumulation patterns can be assessed by Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Magnetic Particle Imaging (MPI) (Ding and Wu, 2012). Although MRI applications have been well characterized and employed on wide range of possibilities, it is unrealistic to base all experimental protocols on a clinical system with expensive maintenance costs. Also, MNPs are used in MRI as contrast agents and therefore susceptible to image artifacts, since one is not monitoring really the nanoparticles but instead the protons in the nearby environment. The MPI system, on the other hand, is an imaging technique developed for tracking MNPs *in vivo* and can also generate real-time images (Gleich and Weizenecker, 2005). However, it is still a costly and complex technique, with series drawbacks concerning unwanted stimulation and therefore it's translational potential (Du et al., 2013).

Alternating current biosusceptometry (ACB) is a biomagnetic system that can be employed to detect and monitor magnetic markers and tracers within the body (Cora et al., 2005, Quini et al., 2012, Calabresi et al., 2015) and in real time. The ACB system has been developed and used by our group to register both uptake and biodistribution features of MNPs and presented excellent results (Prospero et al., 2017, Quini et al., 2017a). The technique acquired notoriety when compared with other techniques, due to its low cost, high temporal resolution and versatility. The instrumental setup allows us to monitor small fractions of high susceptibility materials *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*.

Recent studies showed that intravenously injected MNPs move firstly to the heart and are efficiently taken up mostly by the liver (Moore et al., 2000, Gaumet et al., 2008) due to efficient entrapment in the discontinuous vasculature and macrophage action, that quickly remove MNPs from the bloodstream (Saito et al., 2007). These findings point to the liver as the responsible for the retention of more than 90% of the injected MNP dose (Cole et al., 2011). Therefore, liver monitoring is essential for a better understanding of MNP's accumulation and biodistribution. Until now, little is known about the outcome and interactions of MNPs in the liver (Park et al., 2016). The liver is a complex network of inter-related cells, which can be conceptualized as being organized in parenchymal cells (hepatocytes) and non-parenchymal cells. This

arrangement includes liver resident macrophages (Kupffer Cells - KC), liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatic stellate cells (Bhatia et al., 2014, Racanelli and Rehmann, 2006).

Mathematical approaches can help to understand the distribution and accumulation of MNPs. Pharmacokinetic models employ differential equations to describe this physiological process (Silva et al., 2016, Al-Jamal et al., 2016, Neubauer et al., 2008b). Furthermore, pharmacokinetic parameters, such as transfer rates, can be estimated and correlated with the properties of MNPs and physiological profiles by fitting *in vivo* experimental biodistribution data into the model (Li et al., 2012). Recently, our group developed and applied an optimized single-channel ACB system to acquire magnetic signals from MNPs in the bloodstream (Prospero et al., 2017), throughout the kidneys (Quini et al., 2012) and accumulating in the liver, followed by an *ex vivo* biodistribution assessment (Quini et al., 2017b). In this way, the next logical step would be to develop a new system, with higher density of sensors, arranged strategically, to acquire simultaneous information from different regions, allowing us to build images from the distribution of MNPs within the animal.

Thus, the main purpose of this study was to develop and apply a protocol, using a new optimized Multichannel ACB System (ACB-MC), to acquire *in vivo* and real-time images of MNPs biodistribution after intravenous injection. Sequentially, we proposed a pharmacokinetic model to explain the bloodstream-liver exchange rates MNPs and biodistribution profiles.

METHODS

Magnetic nanoparticles

We employed citrate coated, manganese ferrite (Ci-MnFe₂O₄) nanoparticles, synthesized by a co-precipitation method as described before (Branquinho et al., 2013). Nanoparticles presented core diameter of 14 ± 5 nm, hydrodynamic size of 45 nm and polydispersion index of 0.34 with a concentration of 70 mg/ml. This MNPs presented a saturation magnetization of 49.8 emu/g

(247 emu/cm³) in powder. For further information about MNPs synthesis and characterization, see Supplementary Information (Section 1).

ACB system

ACB Principles of Operation

The system works as a double magnetic flux transformer, consisting of two pairs of coils (excitation and detection), in which the most distant pair from the sample acts as a reference. Each pair of coils is separated by a baseline to minimize interference between them. The detector coils are arranged in a first-order gradiometric configuration, connected in opposite directions so the magnetic fluxes concatenated in each detector are subtracted. This configuration eliminates environmental noise and increase the sensitivity of the system (Baffa et al., 1995). The signal response is minimized in the absence of magnetic material. A 200 mA, 10 kHz alternating current is applied to the excitation coils, inducing a secondary current in the detector (internal) coils, so that each pair of coils (excitation/detection) can be considered as a magnetic flux transformer. When any material with high magnetic susceptibility is placed near the detector coil, it creates an imbalance in the total magnetic flux of the system, thus generating an electrical signal (Miranda et al., 1992). This signal can be measured, digitized, and recorded online by a sensitive-to-phase amplifier (lock-in), an analog/digital board, and a computer, respectively.

ACB Multichannel System

We developed the multichannel feature by increasing the diameter of the excitation coils and adding more detector coils into the system, as described before (Cora et al., 2003, Cora et al., 2005, Cora et al., 2010). Cora et al., developed and applied a system containing one pair of excitation coils (with radius of 11 cm) and seven pairs of detection coils (with radius of 2 cm), distributed circularly within the excitation coil, to detect the disintegration process of magnetically marked (using ferrite's powder) tablets in the human stomach. In that case, the system built was optimized to detect large amounts of magnetic material (1.0 g of ferrite's

powder compressed in 10 mm tablet). To acquire magnetic images from the MNPs moving inside the animal's body, we built a new ACB-MC system composed of a pair of excitation coils (with radius of 10.5 cm) and ten pairs of detection coils (with radius of 1 cm) distributed in an elliptical distribution (Figure 1A). This configuration was chosen in order to best cover the entire thoracic and abdominal regions of the animal. Here, we chose to keep the diameter of excitation coil while decreasing the radius of the detectors. This setup provided us with higher field homogeneity and prevented sensitivity variations between the detection coils. This new optimized design enabled a better spatial resolution and minimal discrepancy in sensitivity between different detection coils.

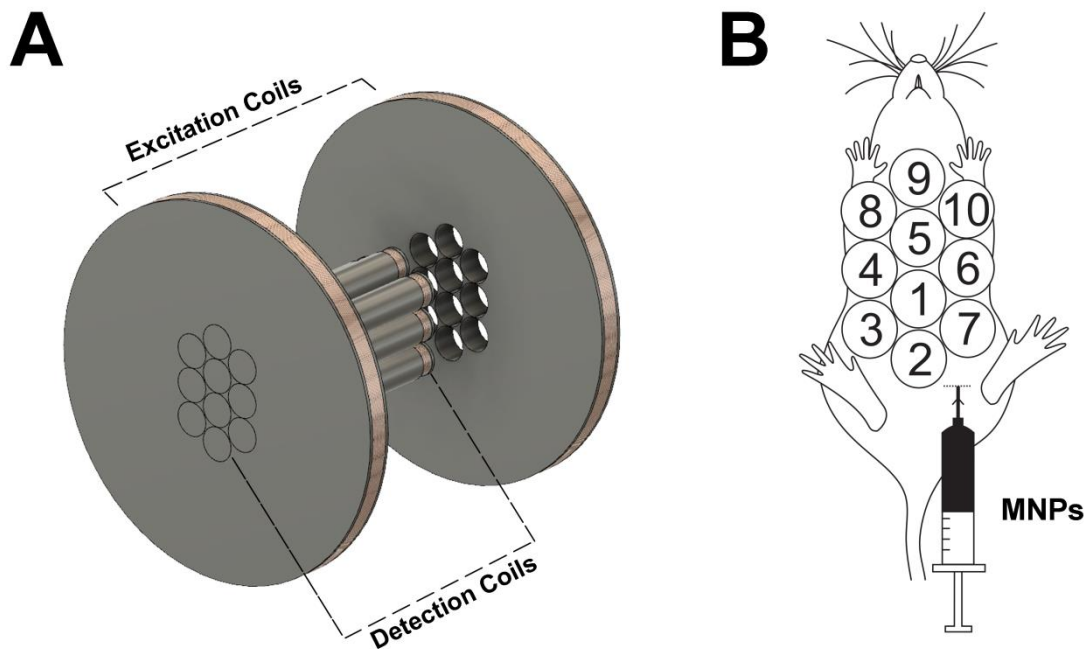


Figure 1. ACB Multichannel System showing excitation and detection coils (A) and experimental setup demonstrating the positioning of the animal on detection coils (B).

Animal Experimentation

All animal experiments were previously approved and performed in accordance with the Committee on Ethics in Animal Use, under the protocol (CEUA)–IBB 885. Seven male *Wistar* rats (250 – 300g; acquired from Animal Laboratory - ANILAB, Paulinia, SP Brazil) were

submitted to same experimental protocol: Each animal was anesthetized with intraperitoneal urethane (1.5 mg/kg), followed by femoral vein cannulation for intravenous MNPs administration. Sequentially, they were positioned on the ACB-MS detection surface and we started the acquisition process (Figure 1B). 300 μ L of $\text{Ci-MnFe}_2\text{O}_4$ nanoparticles were injected intravenously, at a administration rate of 30 μ L/s, and the ACB-MC signal was recorded for 60 minutes after injection. After the signal acquisition, all of the animals still under anesthesia, were sacrificed by decapitation.

Data processing

Signal processing and quantification were performed using OriginPro 8 (OriginLab®) and Matlab 2014 (Mathworks®) software. From the spatial distribution of the detectors and their sensitivity profile, the ACB-MS system presents a field of view (FOV) of 140x140 mm, which was represented by a matrix of 14x14 with 10 mm space between each point. The value of each point was calculated by fitting the data of each sensor to the sensitivity profile. This matrix undergoes an iterative interpolation process (spline method itted four times) changing the matrix size to 209x209. After interpolation, the pixel intensity was normalized and displayed through colormap based visualization. Signal acquisition consisted of sequential images (frames) obtained with a sampling frequency of 20 Hz. The resulting video is available in the Supplementary Material.

Image Quantification

To analyze the signal profile in a given region, we selected regions of interest (ROIs) in specific frames regarding the heart and liver regions. We assessed the bloodstream content by delimitating a ROI in one frame at the initial instants of the recording, right after MNP infusion, when the heart region presented the highest intensity. The liver was assessed by the selection of a ROI in the last frame of the video, when there are no MNPs in the bloodstream. After the ROIs selection, the image quantification algorithm calculates the intensity average within the region for all of the frames in the video. Through this quantification process, we were able to

evaluate the dynamics of MNPs biodistribution in the animals over time. To compare our results with the literature data, the circulation time was accessed by fitting the data to a single exponential decay from the heart region, allowing us to assess the half-life of the MNPs in the bloodstream.

Pharmacokinetic model

The model proposed describes balance of MNPs in the bloodstream and its uptake in the liver. The pharmacokinetic model is composed by three steps: a first moment considering MNPs circulating in bloodstream, a second moment when MNPs interact with the hepatic sinusoid, and a third moment when MNPs are captured by Kupffer cells within the liver (Walkey and Chan, 2012). Despite knowing that there are many uptake and clearance pathways of magnetic nanoparticles (Yu and Zheng, 2015), our pharmacokinetic model only considered the removal of MNPs by the liver. We only considered transfer rates relationship between healthy organs, disregarding diseases or physiological changes. A more comprehensive mathematical representation of the model is given in the Supplementary Material (Section 2).

Main mathematical description of the model

The pharmacokinetic model is a reformulation of the one described firstly by Rossum et al (J. M. van Rossum, 1977). In our adaptation, we assume that the interaction between the bloodstream and the liver occurs in two paths: liver sinusoid realizes bi-directional changes with the bloodstream while the Kupffer cells accumulate the MNPs for biotransformation, as shown in equation 1.



where S is the hepatic sinusoids, N is the amount of MNPs and NKC is the amount of Kupffer cell interact with MNPs. By adaptation, we proposed the following ordinary differential equation (ODE) model, described by equations 2, 3 and 4:

$$\frac{dQ_N}{dt} = -k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) + k_2 (Q_{SN}) + q(t) \quad (2)$$

$$\frac{dQ_{SN}}{dt} = k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) - (k_2 + k_3) Q_{SN} \quad (3)$$

$$\frac{dQ_{KC}}{dt} = k_3 Q_{SN} \quad (4)$$

where Q_N is the amount of MNPs circulating in blood, Q_{SN} is the amount of hepatic sinusoids that interacted with MNPs, Q_S is the amount of sinusoids characterized by sum of the hepatic sinusoids that did not interact with MNPs and hepatic sinusoids that interacted with MNPs, Q_{KC} is the amount of MNPs that interact with Kupffer cells. $k_1(s^{-1})$ is the kinetic transfer rate from Q_N to Q_{SN} , while $k_2(s^{-1})$ is the kinetic transfer rate from Q_{SN} to Q_N and $k_3(s^{-1})$ is the kinetic transfer rate from Q_{SN} to Q_{KC} . $q(t)$ is a function that models the infusion rate of MNPs, which is non-zero only in "small", finite amounts of time.

Implementation of the model

The pharmacokinetic model was implemented in Octave version 4.2.1. Parameters with unknown values were optimized by fitting the unknown model parameters to the experimental data using the Runge-Kutta Method ode45 (Dormand, 1980). All parameters were estimated simultaneously through the least square optimization method (Metzler, 1987). This is a commonly used method for nonlinear curve fitting. The following parameters were fitted: k_1, k_2, k_3 and Q_{SN} .

Analysis of model accuracy

To accurately evaluate the data acquired from the pharmacological model, we correlated the heart and liver results with experimental data. A linear fit further indicated how close this

correlation was in terms of percentage. A coefficient of 1 indicates that the regression line perfectly fits the data.

RESULTS

Data processing and Image quantification

From the data acquired by the ACB-MC system, it was possible to generate a dynamic video that shows the MNPs in different stages of accumulation over time (*i.e.* dynamic biodistribution, see Supplementary Information - Video) for each animal. These recordings suggest the possibility of accessing the instant that the particles arrive in the heart of the animal, followed by a fast accumulation process and subsequential emptying from the organ (herein referred as compartment for modeling purposes), which is representative of the MNP in the bloodstream for our analysis. Additionally, we simultaneously accessed the increase of the particles concentration in the liver, indicating a transfer relationship between these compartments (bloodstream and liver) regarding MNP distribution and uptake.

Figure 2 shows four time points captured representing the dynamic process of biodistribution *in vivo* for these nanocarriers. Each frame is characterized by two high intensity regions, one superior and one inferior, suggesting the regions where the heart and liver were positioned, respectively. The display of colors showed higher intensity (red) for higher concentration of MNPs.

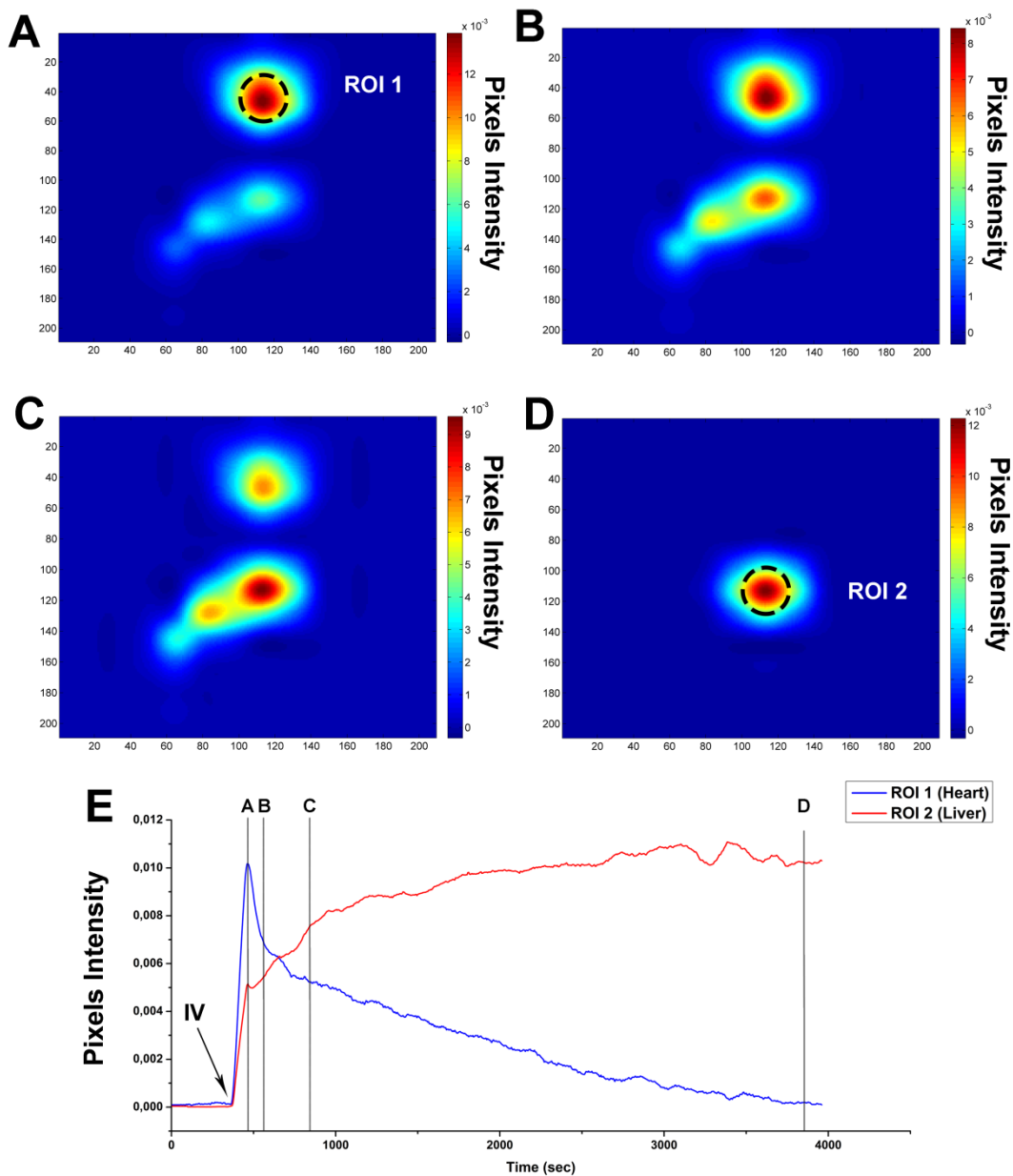


Figure 2. Representation of the biodistribution by frames after injection and the specific ROIs selected to access the pharmacokinetic parameters. (A) Shows high and low concentration of MNPs in the heart and in the liver, respectively (B) Shows an increased intensity in the liver, indicating initial uptake. (C) Shows the higher uptake phase, characterized by a reduction in heart intensity while a greater intensity is presented in the liver. (D) Indicates the final biodistribution process, characterized by a solely higher intensity signal in the liver. (E) Average intensity along the time for both ROI 1 (heart region) and ROI 2 (liver region). The black lines indicate the time points in which A, B, C and D were captured. IV shows when the particles were injected (Intravenous injection – IV).

Figure 2 shows a decrease over time for ROI 1 and an increase for ROI 2. Such profile was expected since this regions correspond to heart and liver(Prospero et al., 2017, Quini et al., 2017a) respectively and were further confirmed by their anatomical position.

Model for biodistribution profile acquisition

Figure 3 illustrates the curve obtained using the model for animal XXX, which showed strong correlation values in comparison to the data acquired ($R = 0.97$ and $R = 0.97$, to heart and liver, respectively). The variation profile observed on both heart and liver indicate a compensatory mechanism between them.

Shortly after infusion, the signal intensity increases rapidly, followed by an exponential-like decay in the heart region. ROI 2 demonstrates a similar (although slower and more intense) increase in intensity, with a saturation tendency in the region corresponding to the liver, also expeted. Thus, these results show good consistency between simulated and experimental data, indicating that the model is adequate for such experimental data interpretation.

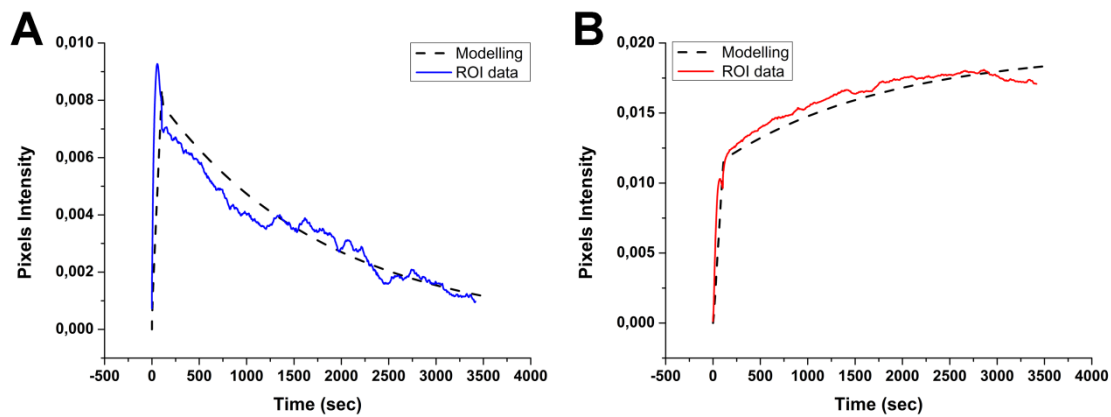


Figure 3. Examples of the curves obtained by the model and adjusted to experimental data for heart (A) and liver (B) regions. The curve model is represented by the dash line.

Analysis of model accuracy

Table 1 shows the correlation coefficients between the model and experimental data, followed by mean and standard deviation (SD). The coefficients were denoted by R^2 .

Table 1. Correlation coefficients between model and experimental data.

Animals	Liver	Heart
1	0.96	0.97
2	0.97	0.97
3	0.80	0.83
4	0.81	0.79
5	0.86	0.80
6	0.96	0.95
7	0.89	0.76
Mean	0.9	0.86714
Standard Deviation	0.07461	0.0925

Transfer Rates

We found the transfer rates between compartments by adjusting the equations in the model to the experimental data utilizing the least square optimization method. The parameters were estimated in both heart and liver, simultaneously. The constants k_1 (1.00037 ± 0.00228) and k_2 (0.09633 ± 0.00877) are related to the exchange between the bloodstream and hepatic sinusoids, while k_3 (0.00174 ± 0.00104) can be attributed to the relationship between the hepatic sinusoids and Kupffer cells.

DISCUSSION

In the present study, we employed a new design of the ACB Multichannel System to detect and monitor MNPs in the bloodstream and its accumulation in the liver *in vivo* and in real-time. Our real-time imaging system effectively reported the dynamic process of the circulation and uptake of the MNPs. We described the first application of an optimized Multichannel AC

Biosusceptometry System (ACB-MC) to assess pharmacokinetic parameters of MNPs by sequential images and video recording.

Currently, detecting and monitoring MNPs *in vivo* became a challenge especially due to temporal resolution limitations. Although some techniques, such as MR Imaging show great results when applied to *in vivo* MNPs detection, there are still serious limitations for its applications, specially related with cost viability and with technical aspects. In the case of MRI, the temporal resolution is limited when applied to monitor the thoracic and abdominal regions due to movement artifacts (Axel, 1986). In fact, to the best of our knowledge, the highest acquisition frequency reported using MRI to detect MNPs *in vivo*, it was 0.1 Hz in both a 9.4 T Bruker Biospec MRI (with a 2.0 x 2.0 cm FOV) (Jain et al., 2008) and a 7 T Bruker ClinScan (Fang et al., 2014). Whereas the acquisition frequency for the ACB-MC system was 20 Hz, due to signal processing optimization, which can be raised up to hundreds of kilohertz. Therefore, we believe the ACB-MC system, more than an alternative tool, can help address temporal resolution issues for very acute processes. Regarding the MPI system, the limited FOV and complexity added to safety issues, limit its possibilities towards *in vivo* applications (Saritas et al., 2013). In the other hand, the ACB Multichannel System permits the enhancement of FOV without resulting in magnetostimulation, with possible upscaling to human studies (Cora et al., 2011).

The temporal data obtained by the ROI selection confirmed previous reports from the literature for both organs (Prospero et al., 2017, Quini et al., 2017a). The intensity variation observed in the heart region was characterized by a quick drop shortly after the initial peak, which resulted from the injection of MNPs, and was followed by the slow decrease at longer time points, possibly marked by the action of the reticuloendothelial system (RES). RES includes monocytes circulating in the blood and macrophages located in different organs, mainly as Kupffer cells in the liver, spleen, lymph nodes, bone marrow, and lungs (Arami et al., 2015). Choi et al. (Choi et al., 2007) showed that Quantum Dots greater than 8 nm (Hydrodynamic Diameter = 8.65 nm) are not excreted by the kidneys, but instead exhibited high

uptake profile in the RES. In another study, Briley-Saebo et al (Briley-Saebo et al., 2006) suggested that intravenously-administered dextran-coated, 100 nm iron oxide nanoparticles were entrapped by liver followed and spleen, been eliminated after 580 days.

The liver retention was characterized by a different profile from the one observed from the heart, presenting a rapid intensity increase, followed by a saturation profile over time. Therefore, we assumed the existence of two physiological processes responsible for the uptake of MNPs. The first was the hepatic vascular aspect, where the blood from both the hepatic artery and portal vein mixes in hepatic sinusoids before the blood drains out from the liver to the heart through the hepatic venous system (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). In the hepatic vascular system, the hepatic sinusoids are covered by Liver Sinusoidal Endothelial Cells (LSECs), which form the continuous lining of the liver capillaries and create sinusoidal fenestrations that allow MNPs to interact with the Kupffer Cells (Zhang et al., 2016). Hence, the final process is completed by the MNP's endocytosis in the Kupffer Cells spread in sinusoids.

The kinetic transfer rates k_1 e k_2 are connected and represent two distinct mechanisms. The k_1 coefficient describes the blood transfer rate from the heart to the hepatic sinusoid, while the kinetic transfer coefficient k_2 indicates the blood outflow from the sinusoid to the central vein and its return to circulation. The MNPs sequestration is characterized by the transfer rate k_3 , where the Kupffer cells, spread along the sinusoid fenestrations, act as the first defense against substances that reach the liver, capturing the MNPs from the blood. We consider the uptake by the Kupffer Cells as the final destination of the MNPs, with no returns to blood circulation beyond this point.

In our adaptation from the pharmacokinetic model of Rossum et al., 1977, the transfer rates constant cannot be compared. Rate constants for different reactions often have different units, depending on the concentrations appearing in the rate law. In Equation (2), its possible observe that the transfer rate k_1 has an inverse time dimension embedded in it, so the units for k_1 is hertz multiplied by a unit of mass or amount. Consequently, the transfer rate k_1 its considered a second order rate law, unlike k_2 and k_3 that considered a first order rate law because has just

units Hertz. Despite this, the pharmacokinetic model presented can be a promising tool able to quantify the transfer rates constants in different situations, like in a cancer or a portal hypertension presence, which mainly alters the hepatic perfusion, and possibly modifying the transfer rates constants values. Our transfer rates results showed a higher value for k_1 , followed by k_2 and k_3 . The transfer parameters depend on several MNPs intrinsic factors (e.g., size, surface charge and coating density) that directly affect their biodistribution and clearance by the RES and renal excretion, not excluding the important interaction of nanoparticle surface with proteins, i.e. the well known phenomena of opsonization or corona effect (Tenzer et al., 2013). Many reports pointed that a more efficient uptake process of the MNPs by cells is presented in nanoparticles with positive surface charges when compared to nanoparticles with negative surface charges. It is known that MNPs with a neutral surface charge have a slower retention rate by the RES or renal elimination (Sun et al., 2008, Ehlerding et al., 2016). Surface modifications, such as protein or polymer coating, also strongly influence the particles circulation time. MNPs that are specifically synthesized and coated to bypass the Kupffer cells, usually have longer circulation time. On biomedical aspects, polyethylene glycol (PEG) modifications result in longer circulation times (Jokerst et al., 2011) after the intravenous administration, which suggests PEG as a transfer rate coefficients modifying agent, probably because it inhibits (or modifies) the protein corona at the nanoparticle surface.

Since the modeling approach showed the transfer relationship between the bloodstream and liver, we believe this model can be applied to study the influence, not just of the nanoparticles surface modifications, but also of the physiological factors, as cardiovascular or hepatic diseases. In future works, it would be interesting to evaluate how the retention mechanisms in the liver are compensated and their relation with other organs when in the presence of lesions or diseases.

The pharmacokinetic model used here is not classified as a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK model) that can predict the MNPs pharmacokinetics from *in vitro* data. Instead, several parameters were estimated by fitting the model to the *in vivo* data

obtained by the ACB-MC system, contributing to the better understanding of the physiological process involved, which can be an advantage of this model.

The ACB-MC system showed great temporal resolution as an *in vivo* and real-time MNPs imaging device. However, the technique still presents limitations, mainly in spatial resolution, when applied to monitor the physiological behavior of smaller organs in rats models. The anatomical structure and the physiological properties of the liver also play a major role in the protocol, since both the volume occupied by the organ and the high percentage of particules accumulated there make it difficult to visualize smaller organs and structures with lower accumulation values.

CONCLUSION

We developed a novel method to generate MNPs images *in vivo* and in real-time. The ACB-MS system offers the possibility to perform data acquisition at different regions simultaneously, presenting a new tool for studies related with MNPs biodistribution and bloodstream-organs accumulation. From the images obtained, it was possible to evaluate the organs pharmacokinetic profiles in specific areas of interest. Improvements on the system should be performed to evaluate these profiles in other organs and to acquire whole body images, including the brain, which is another organ that attracts a great interest from the scientific community regarding MNPs applications.

We also recorded videos illustrating MNPs dynamic process of the circulation (heart) and accumulation (liver). From these videos information, the pharmacokinetic model was able to describe the MNPs pharmacokinetic profiles in the bloodstream and its retention in the liver. The model also provided insights into the *in vivo* MNPs kinetics of the distribution, collaborating to further understanding on the mechanisms of nanoparticles biodistribution based on the communication between bloodstream and liver.

REFERENCES

- ABDEL-MISIH, S. R. & BLOOMSTON, M. 2010. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90, 643-53.
- ABUJUDEH, H. H., KAEWLAI, R., KAGAN, A., CHIBNIK, L. B., NAZARIAN, R. M., HIGH, W. A. & KAY, J. 2009. Nephrogenic systemic fibrosis after gadopentetate dimeglumine exposure: case series of 36 patients. *Radiology*, 253, 81-9.
- AGOSTINHO, M., AMERICO, M. F., MARQUES, R. G., ZANDONA, E. A., STELZER, M., CORA, L. A., ANDREIS, U., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2010. AC Biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2010, 5740-3.
- AL-JAMAL, K. T., BAI, J., WANG, J. T., PROTTI, A., SOUTHERN, P., BOGART, L., HEIDARI, H., LI, X., CAKEBREAD, A., ASKER, D., AL-JAMAL, W. T., SHAH, A., BALS, S., SOSABOWSKI, J. & PANKHURST, Q. A. 2016. Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans. *Nano Lett*, 16, 5652-60.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L. K. & FAROKHZAD, O. C. 2008. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5, 505-515.
- ALMEIDA, J. P., CHEN, A. L., FOSTER, A. & DREZEK, R. 2011. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 6, 815-35.
- ARAMI, H., KHANDHAR, A., LIGGITT, D. & KRISHNAN, K. M. 2015. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*, 44, 8576-607.
- ARAMI, H., TEEMAN, E., TROKSA, A., BRADSHAW, H., SAATCHI, K., TOMITAKA, A., GAMBHIR, S. S., HAFELI, U. O., LIGGITT, D. & KRISHNAN, K. M. 2017. Tomographic magnetic particle imaging of cancer targeted nanoparticles. *Nanoscale*, 9, 18723-18730.
- ASO, R., OHASHI, K., KATOH, T. & OGATA, H. 2001. Population pharmacokinetics, protein binding and antiarrhythmic effects of disopyramide enantiomers in arrhythmic patients. *Int J Clin Pharmacol Res*, 21, 137-46.
- AXEL, L. 1986. Blood flow effects in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Annu*, 237-44.
- BAFFA, O., OLIVEIRA, R. B., MIRANDA, J. R. & TRONCON, L. E. 1995. Analysis and development of AC biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements. *Med Biol Eng Comput*, 33, 353-7.
- BAKUZIS, A. F., BRANQUINHO, L. C., E CASTRO, L. L., E ELOI, M. T. & MIOTTO, R. 2013. Chain formation and aging process in biocompatible polydisperse ferrofluids: experimental investigation and Monte Carlo simulations. *Adv Colloid Interface Sci*, 191-192, 1-21.
- BALL, K., BOUZOM, F., SCHERRMANN, J. M., WALTHER, B. & DECLEVES, X. 2013. Physiologically based pharmacokinetic modelling of drug penetration across the blood-brain barrier--towards a mechanistic IVIVE-based approach. *AAPS J*, 15, 913-32.
- BARBOSA, M. V., MONTEIRO, L. O., CARNEIRO, G., MALAGUTTI, A. R., VILELA, J. M., ANDRADE, M. S., OLIVEIRA, M. C., CARVALHO-JUNIOR, A. D. & LEITE, E. A. 2015. Experimental design of a liposomal lipid system: A potential strategy for paclitaxel-based breast cancer treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 136, 553-61.
- BENET, L. Z. & ZIA-AMIRHOSSEINI, P. 1995. Basic principles of pharmacokinetics. *Toxicol Pathol*, 23, 115-23.
- BERTRAND, N. & LEROUX, J. C. 2012. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. *J Control Release*, 161, 152-63.
- BHATIA, S. N., UNDERHILL, G. H., ZARET, K. S. & FOX, I. J. 2014. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med*, 6, 245sr2.
- BLACK, K. C., AKERS, W. J., SUDLOW, G., XU, B., LAFOREST, R. & ACHILEFU, S. 2015. Dual-radiolabeled nanoparticle SPECT probes for bioimaging. *Nanoscale*, 7, 440-4.

- BRANQUINHO, L. C., CARRIAO, M. S., COSTA, A. S., ZUFELATO, N., SOUSA, M. H., MIOTTO, R., IVKOV, R. & BAKUZIS, A. F. 2013. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. *Sci Rep*, 3.
- BRILEY-SAEBO, K. C., JOHANSSON, L. O., HUSTVEDT, S. O., HALDORSEN, A. G., BJORNERUD, A., FAYAD, Z. A. & AHLSTROM, H. K. 2006. Clearance of iron oxide particles in rat liver: effect of hydrated particle size and coating material on liver metabolism. *Invest Radiol*, 41, 560-71.
- BULLIVANT, J. P., ZHAO, S., WILLENBERG, B. J., KOZISSNIK, B., BATICH, C. D. & DOBSON, J. 2013. Materials characterization of Feraheme/ferumoxytol and preliminary evaluation of its potential for magnetic fluid hyperthermia. *Int J Mol Sci*, 14, 17501-10.
- CALABRESI, M. F., QUINI, C. C., MATOS, J. F., MORETTO, G. M., AMERICO, M. F., GRACA, J. R., SANTOS, A. A., OLIVEIRA, R. B., PINA, D. R. & MIRANDA, J. R. 2015. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study. *Neurogastroenterol Motil*, 27, 1613-20.
- CARAVAN, P. 2006. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev*, 35, 512-23.
- CHAN, V. & PERLAS, A. 2011. *Basics of Ultrasound Imaging*.
- CHAPMAN, S., DOBROVOLSKAIA, M., FARAHANI, K., GOODWIN, A., JOSHI, A., LEE, H., MEADE, T., POMPER, M., PTAK, K., RAO, J., SINGH, R., SRIDHAR, S., STERN, S., WANG, A., WEAVER, J. B., WOLOSCHAK, G. & YANG, L. 2013. Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. *Nano Today*, 8, 454-460.
- CHOI, H. S., LIU, W., MISRA, P., TANAKA, E., ZIMMER, J. P., IPE, B. I., BAWENDI, M. G. & FRANGIONI, J. V. 2007. Renal Clearance of Nanoparticles. *Nature biotechnology*, 25, 1165-1170.
- CHRASTINA, A. & SCHNITZER, J. E. 2010. Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging. *Int J Nanomedicine*, 5, 653-9.
- COLE, A. J., DAVID, A. E., WANG, J., GALBAN, C. J. & YANG, V. C. 2011. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 6291-301.
- CONDEELIS, J. & WEISSLEDER, R. 2010. In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003848.
- CORA, A., ANDREIS, U., ROMEIRO, F. G., AMERICO, M. F., OLIVEIRA, R. B., BAFFA, O. & MIRANDA, J. R. A. 2005. Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry. *Phys Med Biol*, 50.
- CORA, L. A., AMERICO, M. F., OLIVEIRA, R. B., BAFFA, O., MORAES, R., ROMEIRO, F. G. & MIRANDA, J. R. 2003. Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current biosusceptometry. *Eur J Pharm Biopharm*, 56, 413-20.
- CORA, L. A., AMERICO, M. F., OLIVEIRA, R. B., SERRA, C. H., BAFFA, O., EVANGELISTA, R. C., OLIVEIRA, G. F. & MIRANDA, J. R. 2011. Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research. *Pharm Res*, 28, 438-55.
- CORA, L. A., AMERICO, M. F., ROMEIRO, F. G., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2010. Pharmaceutical applications of AC biosusceptometry. *Eur J Pharm Biopharm*, 74, 67-77.
- CROMER BERMAN, S. M., WALCZAK, P. & BULTE, J. W. M. 2011. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 3, 343-355.
- DEVANE, C. L. 1983. Pharmacokinetics (2nd edn, revised and expanded), M. Gibaldi and D. Perrier (Vol. 15 of Drugs and the pharmaceutical sciences), Marcel Dekker, New York, 1982. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 4, 201-201.
- DING, H. & WU, F. 2012. Image guided biodistribution and pharmacokinetic studies of theranostics. *Theranostics*, 2, 1040-53.

- DIPIRO, J. T. & AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. 2010. *Concepts in clinical pharmacokinetics*, Bethesda, MD, American Society of Health-System Pharmacists.
- DOBROVOLSKAIA, M. A., AGGARWAL, P., HALL, J. B. & MCNEIL, S. E. 2008. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*, 5, 487-95.
- DORMAND, J. R. P., P.J. 1980. A family of embedded Runge-Kutta formulae. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Volume 6, 19-26.
- DU, Y., LAI, P. T., LEUNG, C. H. & PONG, P. W. 2013. Design of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging (MPI). *Int J Mol Sci*, 14, 18682-710.
- DURISOVA, M. & DEDIK, L. 2005. New mathematical methods in pharmacokinetic modeling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96, 335-42.
- DUTZ, S., MULLER, R., EBERBECK, D., HILGER, I. & ZEISBERGER, M. 2015. Magnetic nanoparticles adapted for specific biomedical applications. *Biomed Tech (Berl)*, 60, 405-16.
- EHLERDING, E. B., CHEN, F. & CAI, W. 2016. Biodegradable and Renal Clearable Inorganic Nanoparticles. *Adv Sci (Weinh)*, 3.
- EILS, R. & ATHALE, C. 2003. Computational imaging in cell biology. *J Cell Biol*, 161, 477-81.
- ESTELRICH, J., SANCHEZ-MARTIN, M. J. & BUSQUETS, M. A. 2015. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*, 10, 1727-41.
- FANG, J., CHANDRASEKHARAN, P., LIU, X. L., YANG, Y., LV, Y. B., YANG, C. T. & DING, J. 2014. Manipulating the surface coating of ultra-small Gd₂O₃ nanoparticles for improved T1-weighted MR imaging. *Biomaterials*, 35.
- FERGUSON, R. M., KHANDHAR, A. P., ARAMI, H., HUA, L., HOVORKA, O. & KRISHNAN, K. M. 2013. Tailoring the magnetic and pharmacokinetic properties of iron oxide magnetic particle imaging tracers. *Biomed Tech (Berl)*, 58, 493-507.
- FERRARI, M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 5, 161-71.
- FRIMPONG, R. A. & HILT, J. Z. 2010. Magnetic nanoparticles in biomedicine: synthesis, functionalization and applications. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 1401-14.
- GALE, E. M., ATANASOVA, I. P., BLASI, F., AY, I. & CARAVAN, P. 2015. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J Am Chem Soc*, 137, 15548-57.
- GALLO-NETO, M. 2012. *Modelagem farmacocinética e análise de sistemas lineares para a predição da concentração de medicamentos no corpo humano*. Mestrado Dissertação (Mestrado), USP.
- GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R. & DELIE, F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 1-9.
- GLEICH, B. & WEIZENECKER, J. 2005. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*, 435, 1214-7.
- GUSTAFSON, H. H., HOLT-CASPER, D., GRAINGER, D. W. & GHANDEHARI, H. 2015. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*, 10, 487-510.
- HAHN, M. A., SINGH, A. K., SHARMA, P., BROWN, S. C. & MOUDGIL, B. M. 2011. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*, 399, 3-27.
- HERMANN, T. W. 2017. *Application of Laplace transforms to a pharmacokinetic open two-compartment body model*.
- HERRNBERGER, L., HENNIG, R., KREMER, W., HELLERBRAND, C., GOEPFERICH, A., KALBITZER, H. R. & TAMM, E. R. 2014. Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS One*, 9, e115005.

- J. M. VAN ROSSUM, C. A. M. V. G., P. T. HENDERSON, H. C. J. KETELAARS, AND T. B. VREE 1977. *Handbook of Experimental Pharmacology: Kinetics of Drug Action*, Springer-Verlag.
- JAIN, T. K., RICHEY, J., STRAND, M., LESLIE-PELECKY, D. L., FLASK, C. A. & LABHASETWAR, V. 2008. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, 29.
- JAMES, M. L. & GAMBHIR, S. S. 2012. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*, 92, 897-965.
- JOKERST, J. V., LOBOVKINA, T., ZARE, R. N. & GAMBHIR, S. S. 2011. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*, 6, 715-28.
- KESTER, M., KARPA, K. D. & VRANA, K. E. 2012. 1 - Pharmacokinetics. *Elsevier's Integrated Review Pharmacology (Second Edition) (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- KEY, J. & LEARY, J. F. 2014. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, 9, 711-26.
- KHERLOPIAN, A. R., SONG, T., DUAN, Q., NEIMARK, M. A., PO, M. J., GOHAGAN, J. K. & LAINE, A. F. 2008. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst Biol*, 2, 74.
- KIM, J.-H., PARK, K., NAM, H. Y., LEE, S., KIM, K. & KWON, I. C. 2007. Polymers for bioimaging. *Progress in Polymer Science*, 32, 1031-1053.
- KIM, Y. K., KWAK, H. S., KIM, C. S., CHUNG, G. H., HAN, Y. M. & LEE, J. M. 2006. Hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: comparison of SPIO-enhanced MR imaging and 16-detector row CT. *Radiology*, 238, 531-41.
- KIRCHER, M. F. & WILLMANN, J. K. 2012. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. part I. principles. *Radiology*, 263, 633-43.
- KISELEV, V. 2017. *Fundamentals of diffusion MRI physics*.
- KOO, H., HUH, M. S., SUN, I. C., YUK, S. H., CHOI, K., KIM, K. & KWON, I. C. 2011. In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc Chem Res*, 44, 1018-28.
- KREUER, S., HAUSCHILD, A., FINK, T., BAUMBACH, J. I., MADDULA, S. & VOLK, T. 2014. Two different approaches for pharmacokinetic modeling of exhaled drug concentrations. *Sci Rep*, 4, 5423.
- KUFE, D., E POLLOCK, R., WEICHSELBAUM, R., BAST, R., S GANSLER, T., HOLLAND, J. & FREI, E. 2003. *Cancer Medicine*, 6th Edition.
- KUMAR, C. S. & MOHAMMAD, F. 2011. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 789-808.
- KUNJACHAN, S., EHLING, J., STORM, G., KIESSLING, F. & LAMMERS, T. 2015. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem Rev*, 115, 10907-37.
- LACAVA, L. M., LACAVA, Z. G. M., AZEVEDO, R. B., CHAVES, S. B., GARCIA, V. A. P., SILVA, O., PELEGRINI, F., BUSKE, N., GANSAU, C., SILVA, M. F. & MORAIS, P. C. 2002. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *J Magn Magn Mater*, 252.
- LANZA, G. M., WINTER, P. M., CARUTHERS, S. D., HUGHES, M. S., CYRUS, T., MARSH, J. N., NEUBAUER, A. M., PARTLOW, K. C. & WICKLINE, S. A. 2006. Nanomedicine opportunities for cardiovascular disease with perfluorocarbon nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 1, 321-9.
- LARTIGUE, L., ALLOYEAU, D., KOLOSNAJ-TABI, J., JAVED, Y., GUARDIA, P., RIEDINGER, A., PECHOUX, C., PELLEGRINO, T., WILHELM, C. & GAZEAU, F. 2013. Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution in situ monitoring. *ACS Nano*, 7, 3939-52.
- LI, M., PANAGI, Z., AVGOUSTAKIS, K. & REINEKE, J. 2012. Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content. *Int J Nanomedicine*, 7, 1345-56.
- LI, S., JOHNSON, J., PECK, A. & XIE, Q. 2017. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. *J Transl Med*, 15, 18.

- LI, X., ZHANG, X. N., LI, X. D. & CHANG, J. 2016. Multimodality imaging in nanomedicine and nanotheranostics. *Cancer Biol Med*, 13, 339-348.
- LUDDEN, T. M. 1991. Nonlinear pharmacokinetics: clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*, 20, 429-46.
- MA, J., XING, L. X., SHEN, M., LI, F., ZHU, M. J., JIN, L. F., LI, Z., GAO, F., SU, Y., DUAN, Y. R. & DU, L. F. 2015. Ultrasound contrast-enhanced imaging and in vitro antitumor effect of paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid)-monomethoxypoly (ethylene glycol) nanocapsules with ultrasound-targeted microbubble destruction. *Mol Med Rep*, 11, 2413-20.
- MACK, M. G., BALZER, J. O., STRAUB, R., EICHLER, K. & VOGL, T. J. 2002. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes. *Radiology*, 222, 239-44.
- MAHMOUDI, M., SANT, S., WANG, B., LAURENT, S. & SEN, T. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 24-46.
- MAO, X., XU, J. & CUI, H. 2016. Functional nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 8, 814-841.
- MATHIASSEN, A. B. & KASTRUP, J. 2013. Non-invasive in-vivo imaging of stem cells after transplantation in cardiovascular tissue. *Theranostics*, 3, 561-72.
- MEDINA, C., SANTOS-MARTINEZ, M. J., RADOMSKI, A., CORRIGAN, O. I. & RADOMSKI, M. W. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150, 552-558.
- MEHVAR, R. 2001. *Principles of Nonlinear Pharmacokinetics*.
- METZLER, C. M. 1987. Extended least squares (ELS) for pharmacokinetic models. *J Pharm Sci*, 76, 565-71.
- MIRANDA, J. R., BAFFA, O., DE OLIVEIRA, R. B. & MATSUDA, N. M. 1992. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Med Phys*, 19, 445-8.
- MIRANDA, J. R., CORA, L. A., AMERICO, M. F. & ROMEIRO, F. G. 2010. AC biosusceptometry technique to evaluate the gastrointestinal transit of pellets under influence of prandial state. *J Pharm Sci*, 99, 317-24.
- MIRANDA, J. R., OLIVEIRA, R. B., SOUSA, P. L., BRAGA, F. J. & BAFFA, O. 1997. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. *Phys Med Biol*, 42, 1791-9.
- MISHRA, N., YADAV, N. P., RAI, V. K., SINHA, P., YADAV, K. S., JAIN, S. & ARORA, S. 2013. Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. *Biomed Res Int*, 2013, 382184.
- MOORE, A., MARECOS, E., BOGDANOV, A., JR. & WEISSLEDER, R. 2000. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*, 214, 568-74.
- MOUNTZ, J. M., ALAVI, A. & MOUNTZ, J. D. 2012. Emerging optical and nuclear medicine imaging methods in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 8, 719-28.
- MULDER, W. J., MCMAHON, M. T. & NICOLAY, K. 2013. The evolution of MRI probes: from the initial development to state-of-the-art applications. *NMR Biomed*, 26, 725-7.
- MURA, S. & COUVREUR, P. 2012. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 1394-416.
- NEUBAUER, A. M., SIM, H., WINTER, P. M., CARUTHERS, S. D., WILLIAMS, T. A., ROBERTSON, J. D., SEPT, D., LANZA, G. M. & WICKLINE, S. A. 2008a. Nanoparticle pharmacokinetic profiling in vivo using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 60, 1353-61.
- NEUBAUER, A. M., SIM, H., WINTER, P. M., CARUTHERS, S. D., WILLIAMS, T. A., ROBERTSON, J. D., SEPT, D., LANZA, G. M. & WICKLINE, S. A. 2008b. Nanoparticle Pharmacokinetic Profiling in vivo using Magnetic Resonance Imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 60, 1353-1361.

- NG, E., TAN, J. H., ACHARYA, U. R. & SURI, J. 2011. *Human Eye Imaging and Modeling*.
- NIE, S. 2010. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 523-8.
- OZDEMIR, V., WILLIAMS-JONES, B., GLATT, S. J., TSUANG, M. T., LOHR, J. B. & REIST, C. 2006. Shifting emphasis from pharmacogenomics to theragnostics. *Nat Biotechnol*, 24, 942-6.
- PAINTAUD, G., ALVAN, G., DAHL, M. L., GRAHNEN, A., SJOVALL, J. & SVENSSON, J. O. 1992. Nonlinearity of amoxicillin absorption kinetics in human. *Eur J Clin Pharmacol*, 43, 283-8.
- PARK, J. K., UTSUMI, T., SEO, Y. E., DENG, Y., SATOH, A., SALTZMAN, W. M. & IWAKIRI, Y. 2016. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine*, 12, 1365-74.
- PAXTON, J. W. 1981. Elementary pharmacokinetics in clinical practice 2: Basic concepts of drug pharmacokinetics. *N Z Med J*, 94, 342-5.
- PEREZ-MEDINA, C., TANG, J., ABDEL-ATTI, D., HOGSTAD, B., MERAD, M., FISHER, E. A., FAYAD, Z. A., LEWIS, J. S., MULDER, W. J. & REINER, T. 2015. PET Imaging of Tumor-Associated Macrophages with 89Zr-Labeled High-Density Lipoprotein Nanoparticles. *J Nucl Med*, 56, 1272-7.
- PROSPERO, A. G., QUINI, C. C., BAKUZIS, A. F., FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P., MORETTO, G. M., MELLO, F. P., CALABRESI, M. F., MATOS, R. V., ZANDONA, E. A., ZUFELATO, N., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2017. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *J Nanobiotechnology*, 15, 22.
- PURUSHOTHAM, S. & RAMANUJAN, R. V. 2010. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater*, 6, 502-10.
- QUINI, C. C., AMERICO, M. F., CORA, L. A., CALABRESI, M. F., ALVAREZ, M., OLIVEIRA, R. B. & MIRANDA, J. R. 2012. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. *J Biol Eng*, 6.
- QUINI, C. C., MATOS, J. F., PRÓSPERO, A. G., CALABRESI, M. F. F., ZUFELATO, N., BAKUZIS, A. F., BAFFA, O. & MIRANDA, J. R. A. 2015. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 2-6.
- QUINI, C. C., PROSPERO, A. G., CALABRESI, M. F. F., MORETTO, G. M., ZUFELATO, N., KRISHNAN, S., PINA, D. R., OLIVEIRA, R. B., BAFFA, O., BAKUZIS, A. F. & MIRANDA, J. R. A. 2017a. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine*, 13, 1519-1529.
- QUINI, C. C., PRÓSPERO, A. G., CALABRESI, M. F. F., MORETTO, G. M., ZUFELATO, N., KRISHNAN, S., PINA, D. R., OLIVEIRA, R. B., BAFFA, O., BAKUZIS, A. F. & MIRANDA, J. R. A. 2017b. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13, 1519-1529.
- RACANELLI, V. & REHERMANN, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43, S54-62.
- RAGHURAM, T. C. & KRISHNASWAMY, K. 1992. Basic concepts of clinical pharmacokinetics. *J Assoc Physicians India*, 40, 29-35.
- RANGGER, C., HELBOK, A., SOSABOWSKI, J., KREMSER, C., KOEHLER, G., PRASSL, R., ANDREAE, F., VIRGOLINI, I. J., VON GUGGENBERG, E. & DECRISTOFORO, C. 2013. Tumor targeting and imaging with dual-peptide conjugated multifunctional liposomal nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8, 4659-71.
- ROGOSNITZKY, M. & BRANCH, S. 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals*, 29, 365-76.

- ROOHI, F., LOHRKE, J., IDE, A., SCHUTZ, G. & DASSLER, K. 2012. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 4447-58.
- SAITO, M., MATSUURA, T., NAGATSUMA, K., TANAKA, K., MAHASHI, H., SHIMIZU, K., HATABA, Y., KATO, F., KASHIMORI, I., TAJIRI, H. & BRAET, F. 2007. The functional interrelationship between gap junctions and fenestrae in endothelial cells of the liver organoid. *J Membr Biol*, 217, 115-21.
- SAMUELSSON, E., SHEN, H., BLANCO, E., FERRARI, M. & WOLFRAM, J. 2017. Contribution of Kupffer cells to liposome accumulation in the liver. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 158, 356-362.
- SANTOS, F. M. S., G.P.E.; NOËL, F. 2004. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam farmacocinética não-linear. In: FARMÁCIA, C. F. D. (ed.). Infarma (Informativo profissional do Conselho Federal de Farmácia)
- SAPSFORD, K. E., ALGAR, W. R., BERTI, L., GEMMILL, K. B., CASEY, B. J., OH, E., STEWART, M. H. & MEDINTZ, I. L. 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev*, 113, 1904-2074.
- SARITAS, E. U., GOODWILL, P. W., CROFT, L. R., KONKLE, J. J., LU, K., ZHENG, B. & CONOLLY, S. M. 2013. Magnetic particle imaging (MPI) for NMR and MRI researchers. *J Magn Reson*, 229, 116-26.
- SCHAAF, L. J., DOBBS, B. R., EDWARDS, I. R. & PERRIER, D. G. 1987. Nonlinear pharmacokinetic characteristics of 5-fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 32, 411-8.
- SCHMITZ, S. A., TAUPITZ, M., WAGNER, S., WOLF, K. J., BEYERSDORFF, D. & HAMM, B. 2001. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging*, 14, 355-61.
- SHARGEL, L. 2012. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, New York, McGraw-Hill.
- SHIN, T. H., CHOI, Y., KIM, S. & CHEON, J. 2015. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem Soc Rev*, 44, 4501-16.
- SHUBAYEV, V. I., PISANIC, T. R., 2ND & JIN, S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 467-77.
- SILVA, A. H., LIMA, E., JR., MANSILLA, M. V., ZYSLER, R. D., TROIANI, H., PISCIOTTI, M. L. M., LOCATELLI, C., BENECH, J. C., ODDONE, N., ZOLDAN, V. C., WINTER, E., PASA, A. A. & CRECZYNSKI-PASA, T. B. 2016. Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles mPEG350- and mPEG2000-coated: cell uptake and biocompatibility evaluation. *Nanomedicine*, 12, 909-919.
- SIMPSON, G. R., RELPH, K., HARRINGTON, K., MELCHER, A. & PANDHA, H. 2016. Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. *Oncolytic Virother*, 5, 1-13.
- SINGH, A. & SAHOO, S. K. 2014. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theragnostics. *Drug Discov Today*, 19, 474-81.
- STEPHEN, Z. R., KIEVIT, F. M. & ZHANG, M. 2011. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Materials today (Kidlington, England)*, 14, 330-338.
- SUN, C., LEE, J. S. & ZHANG, M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1252-65.
- TAY, Z. W., GOODWILL, P. W., HENSLEY, D. W., TAYLOR, L. A., ZHENG, B. & CONOLLY, S. M. 2016. A High-Throughput, Arbitrary-Waveform, MPI Spectrometer and Relaxometer for Comprehensive Magnetic Particle Optimization and Characterization. *Scientific Reports*, 6, 34180.
- TENZER, S., DOCTER, D., KUAREV, J., MUSYANOVYCH, A., FETZ, V., HECHT, R., SCHLENK, F., FISCHER, D., KIOUPTSI, K., REINHARDT, C., LANDFESTER, K., SCHILD, H., MASKOS, M.,

- KNAUER, S. K. & STAUBER, R. H. 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*, 8, 772-81.
- TILLEMENT, J. P. & TREMBLAY, D. 2007. 5.02 - Clinical Pharmacokinetic Criteria for Drug Research. In: TAYLOR, J. B. & TRIGGLE, D. J. (eds.) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier.
- TOSI, G., FANO, R. A., BONDIOLI, L., BADIALI, L., BENASSI, R., RIVASI, F., RUOZI, B., FORNI, F. & VANDELLI, M. A. 2011. Investigation on mechanisms of glycopeptide nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier. *Nanomedicine (Lond)*, 6, 423-36.
- TRAN, T. D., CARUTHERS, S. D., HUGHES, M., MARSH, J. N., CYRUS, T., WINTER, P. M., NEUBAUER, A. M., WICKLINE, S. A. & LANZA, G. M. 2007. Clinical applications of perfluorocarbon nanoparticles for molecular imaging and targeted therapeutics. *Int J Nanomedicine*, 2, 515-26.
- TSOI, K. M., MACPARLAND, S. A., MA, X. Z., SPETZLER, V. N., ECHEVERRI, J., OUYANG, B., FADEL, S. M., SYKES, E. A., GOLDARACENA, N., KATHS, J. M., CONNEELY, J. B., ALMAN, B. A., SELZNER, M., OSTROWSKI, M. A., ADEYI, O. A., ZILMAN, A., MCGILVRAY, I. D. & CHAN, W. C. 2016. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nat Mater*, 15, 1212-1221.
- TURFUS, S. C., DELGODA, R., PICKING, D. & GURLEY, B. J. 2017. Chapter 25 - Pharmacokinetics. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press.
- ULBRICH, K., HOLA, K., SUBR, V., BAKANDRITSOS, A., TUCEK, J. & ZBORIL, R. 2016. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem Rev*, 116, 5338-431.
- VEISEH, O., GUNN, J. & ZHANG, M. 2010. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 62, 284-304.
- VUGMEYSTER, Y., XU, X., THEIL, F.-P., KHAWLI, L. A. & LEACH, M. W. 2012. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3, 73-92.
- WAGNER, J. G. 1981. History of pharmacokinetics. *Pharmacol Ther*, 12, 537-62.
- WAHAJUDDIN & ARORA, S. 2012. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplateforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, 7, 3445-71.
- WALKEY, C. D. & CHAN, W. C. 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev*, 41, 2780-99.
- WILLMANN, J. K., VAN BRUGGEN, N., DINKELBORG, L. M. & GAMBHIR, S. S. 2008. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 591-607.
- XI, D., DONG, S., MENG, X., LU, Q., MENG, L. & YE, J. 2012. Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents. *RSC Advances*, 2, 12515-12524.
- YE, Y. & CHEN, X. 2011. Integrin targeting for tumor optical imaging. *Theranostics*, 1, 102-26.
- YU, M. & ZHENG, J. 2015. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. *ACS Nano*, 9, 6655-74.
- YU, W., JI, J., XIAO, T., YING, C., FANG, J., SHEN, P. & XIAO, Y. 2017. Determining optimal dosing regimen of oral administration of dicloxacillin using Monte Carlo simulation. *Drug Des Devel Ther*, 11, 1951-1956.
- ZHANG, Y. N., POON, W., TAVARES, A. J., MCGILVRAY, I. D. & CHAN, W. C. W. 2016. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release*, 240, 332-348.
- ZHEN CHENG, X. Y., XILIN SUN, BAOZHONG SHEN, SANJIV SAM GAMBHIR 2016. Tumor Molecular Imaging with Nanoparticles. *Engineering*, 2, 132-140.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Multichannel AC Biosusceptometry system to access in vivo pharmacokinetic profiles of magnetic nanoparticles by images

Guilherme A. Soares ^a, André G. Próspero ^a, Marcos F. F. Calabresi^a, Diego S. Rodrigues ^b, Caio C. Quini ^a, Ronaldo R.V. Matos ^a, Leonardo A. Pinto ^a, Ailton A. Sousa-Junior ^c, Andris F. Bakuzis ^c, Paulo F.A. Mancera ^b, Jose R.A. Miranda ^a

^a Laboratório de Biomagnetismo, Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^c Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

Section 1

We performed a dynamic light scattering experiment in order to measure the hydrodynamic diameter (HD) and the polydispersion index (PDI) of the MNPs. From the transmission electron microscope images, we calculated the MNPs core diameter. These results are presented in Table 1.

Table 1. The hydrodynamic diameter (HD) and polydispersion index (PDI) of the colloid by a dynamic light scattering experiment and MNPs' core diameter distribution, calculated by transmission electron microscope.

TEM	DLS	
D_{mean} (nm)	D_h (nm)	PDI
14 ± 5	45	0.34

The magnetization curve of the MNPs was obtained using a Vibrating Sample Magnetometer. We analyzed the powder sample and the colloidal solution of the MNPs to calculate the colloidal solution concentration. Table 2 present the magnetization saturation (M_{sf} and M_{sp}) values obtained from the magnetization curves and the MNPs' calculated concentration.

Table 2. Values obtained from the magnetization curves.

M_{sf} (emu/g)	M_{sp} (emu/g)	Concentration (mg/ml)
1.1	49.8	70

Section 2

1 Introduction

Enzymes localized in the smooth endoplasmic reticulum of liver cells routes of biotransformation. Enzymatic conversion can be described by equations:



where E is the enzyme and S the substrate. Based on this reaction equation, J. M. van Rossum et al. proposed the following ordinary differential equation (ODE) model [1]:

$$\frac{dQ_s}{dt} = -k_1 C_s Q_e + k_2 Q_{es} \quad (2)$$

$$\frac{dQ_{es}}{dt} = k_1 C_s Q_e - k_2 Q_{es} - k_3 Q_{es} \quad (3)$$

$$\frac{dQ_p}{dt} = k_3 Q_{es} \quad (4)$$

where Q_e is the quantity of free enzyme, Q_{es} is the quantity of occupied enzyme, Q_s is the quantity of substrate, Q_p is the quantity of products formed, and C_s is the substrate concentration.

The pharmacokinetic model was adapted from the one described firstly by Rossum et al. 1977. In our adaption, we assume that the interaction of the MNPs between the bloodstream and the liver occurs in two paths: liver sinusoid realizes bi-directional changes with the bloodstream while the Kupffer cells accumulate the MNPs for biotransformation.

From this, we convert the parameters of equations. E, S and products are the quantity of hepatic sinusoids, S is the amount of MNPs and products are the quantity of Kupffer cell interact with MNPs , respectively.

We assume that Q_e , Q_{es} , Q_s and Q_p can be represented by a amount of hepatic sinusoids free (Q_{SF}), amount of hepatic sinusoids that interact with MNPs (Q_{SN}), amount of MNPs (Q_N), amount of MNPs that interact with Kupffer cells (Q_{KC}), respectively.

The sum of free enzyme Q_{SF} and occupied enzyme Q_{SN} may be considered to be constant and equal to the total quantity of enzyme Q_S :

$$Q_{SF} + Q_{SN} = Q_S \quad (5)$$

In addition to that, since the substrate concentration is given by:

$$Q_S = \frac{Q_s}{V} \quad (6)$$

where V is the volume of distribution, the system (2) – (4) reads . The volume in our model is considered equal to one.

$$\frac{dQ_N}{dt} = -k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) + k_2 (Q_{SN}) \quad (7)$$

$$\frac{dQ_{SN}}{dt} = k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) - (k_2 + k_3) Q_{SN} \quad (8)$$

$$\frac{dQ_{KC}}{dt} = k_3 Q_{SN} \quad (9)$$

The sum of the rates defined by (7)-(9) - is zero for any time t, i.e.,

$$\frac{dQ_N}{dt} + \frac{dQ_{SN}}{dt} + \frac{dQ_{KC}}{dt} = 0 \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt}(Q_N + Q_{SN} + Q_{KC}) = 0 \quad (11)$$

And then

$$Q_N(t) + Q_{SN} + Q_{KC} = 0 \quad (12)$$

where Q_T is a constant quantity over time that comprises all the states of MNPs. By means of equation (12), one can consider a reduced version of (7)-(9) only with the equations (7)-(8),

$$\frac{dQ_N}{dt} = -\frac{k_1}{V} Q_N (Q_S - Q_{SN}) + k_2 (Q_{SN}) \quad (13)$$

$$\frac{dQ_{SN}}{dt} = -k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) - (k_2 - k_3) Q_{SN} \quad (14)$$

because for any given time t the value of $Q_{KC}(t)$ must be such that (12) holds.

2 Intravenous administration modeling

Without loss of generality, let's now suppose that there is no substrate into the system prior to $t = 0$, and that this is the time in which the substrate is administered intravenously. Thus, $Q_N(0) = 0$ and also $Q_{SN}(0) = Q_{KC}(0) = 0$, since up to time $t = 0$ there is no MNPs in the circulation.

In order to model a bolus infusion of the substrate in the bloodstream, we add a time-dependent term on the right hand side of equation (7), $q = q(t)$. It models an infusion rate which is non-zero only in “small”, finite amounts of time, for single or multiple administrations. Irrespectively, the accumulated amount of substrate administered up to the time t' is given by

$$D = \int_0^t q(t)dt \quad (14)$$

With the addition of the forcing term $q = q(t)$, the system (5)-(7) reads

$$\frac{dQ_N}{dt} = -k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) + k_2 (Q_{SN}) + q(t) \quad (15)$$

$$\frac{dQ_{SN}}{dt} = k_1 Q_N (Q_S - Q_{SN}) - (k_2 + k_3) Q_{SN} \quad (16)$$

$$\frac{dQ_{KC}}{dt} = k_3 Q_{SN} \quad (17)$$

In a steady-state, a stronger condition than (10) holds: each time derivative of Q_N , Q_{SN} and Q_{KC} is zero on its own, since in equilibrium solution these quantities do not change in time anymore.

Assuming that the number of infusions is finite, then $q(t)$ vanishes for sufficiently large time values. Accordingly, the stability analysis of the ODE system (16)-(18) can be performed over its reduced version (13)-(14).

The reduced system (13)-(14) has a unique steady-state $(Q_N, Q_{SN}) = (0, 0)$. Due to (12), then $Q_{KC} = Q_T - Q_N - Q_{SN} = Q_T$. It can be proved by classical linear stability analysis that the state (0,0) is unconditionally globally asymptotically stable, with two real negative eigenvalues. Eventually, then, all the infused substrate will end in a product form accumulated in the liver.

3 References

[1] J. M. van Rossum, C. A. M. van Ginneken, P. T. Henderson, H. C. J. Ketelaars, and T. B. Vree, Handbook of Experimental Pharmacology: Kinetics of Drug Action, ch. Pharmacokinetics of Biotransformation. Berlin: Springer-Verlag, 1977.

Conclusão

Baseando-se nos resultados obtidos e os objetivos propostos, conclui-se que o sistema BAC é capaz de detectar e monitorar NPMs *in vivo* em tempo real e com alta resolução temporal. A técnica pode ser considerada um novo método biomagnético para realização de imagens dinâmicas acerca da circulação e acúmulo das NPMs em tempo real. Particularmente, o sistema mostrou-se eficaz em avaliar a circulação das NPMs no compartimento vascular e seu posterior acúmulo no fígado. De forma inédita, através do sistema BAC Muticanal, a circulação e acúmulo das NPMs foram acompanhadas por imagens sequenciais, no formato de vídeo, no qual foi possível observar a transição do material magnético desde o início, com a infusão das NPMs, até o posterior acúmulo no fígado.

Deve-se destacar também a capacidade do sistema BAC de detectar NPMs de forma simples e direta, sem a necessidade de marcação com material radioativo, consolidando-se com uma nova ferramenta para estudos relacionados com a biodistribuição de NPMs. A partir das imagens obtidas, foi possível avaliar os perfis farmacocinéticos dos órgãos em áreas específicas de interesse.

Outro ponto a se destacar é a versatilidade do sistema, no qual foi possível desenvolver um novo arranjo estratégico com um número maior de sensores. Isso deixa em aberto a possibilidade de novos arranjos a serem desenvolvidos a fim de aperfeiçoar a detecção de NPMs e qualidade de realização de imagens. Esses avanços no sistema BAC permitirão avaliar a biodistribuição das NPMs em outros órgãos, realizando o imageamento de corpo inteiro. Além disso, a execução desse trabalho deve estimular a aplicação da técnica em um problema real futuramente, numa possível avaliação da biodistribuição através das imagens dinâmicas das NPMs em tumores. A avaliação da

biodistribuição de diferentes NPMs com diferentes revestimentos também pode vir a ser realizado pelo sistema BAC.

O modelo farmacocinético desenvolvido foi capaz de descrever detalhadamente o processo de circulação das NPMs no sangue e principalmente a sua absorção no fígado. As equações propostas pelo modelo foram em conformidade com os eventos biológicos, e assim o modelo investigou particularidades da captação hepática, quantificando as constantes de transferência entre o compartimento vascular, sinusóides hepáticos e as células de Kupffer. Vale ressaltar que o ajuste do modelo com o dado experimental foi considerado satisfatório, possibilitando a quantificação das constantes de transferência, de forma inédita.