

APLICAÇÃO DO SISTEMA DE BIOSUSCEPTOMETRIA AC PARA O MONITORAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA

André Gonçalves Próspero

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para a obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia Celular Estrutural
e Funcional

Prof. Adj. José Ricardo de Arruda Miranda

BOTUCATU – SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

APLICAÇÃO DO SISTEMA DE BIOSUSCEPTOMETRIA AC
PARA O MONITORAMENTO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA

ANDRÉ GONÇALVES PRÓSPERO

PROF. ADJ. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

PROF. AS. PATRÍCIA FIDELIS DE OLIVEIRA GREGOLINI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional

Prof. Adj. José Ricardo de Arruda Miranda

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Próspero, André Gonçalves.

Aplicação do sistema de biosusceptometria AC para o monitoramento de nanopartículas magnéticas na circulação sanguínea / André Gonçalves Próspero. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini

Capes: 20903006

1. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 2. Coração - Fisiologia. 3. Nanopartículas. 4. Biomagnetismo. 5. Sangue - Circulação.

Palavras-chave: Biodistribuição; Biomagnetismo;
Biosusceptometria AC; Fisiologia cardiovascular ;

Dedico esse trabalho a minha mãe Marben Maria Gonçalves Próspero e ao meu pai Alaor Eduardo Próspero, que nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso durante todas as fases da minha vida. Sem vocês eu não conseguiria ter chegado até aqui. E também à minha companheira Sabrina Galetti Cherelli, por toda ajuda, incentivo, paciência, carinho e força que foram essenciais durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à DEUS, pela vida maravilhosa que tenho e por sempre estar presente e me guiar em todas as minhas decisões.

Agradeço aos meus pais, Alaor Eduardo e Marben Maria, que apesar das dificuldades sempre acreditaram em mim, me incentivaram incondicionalmente e torceram pelo meu sucesso.

Agradeço ao meu irmão Alexandre, por me dar força, e por estar ao meu lado durante toda minha vida.

À toda minha família: avós, tios, primos, que sempre me deram energia para conseguir terminar essa caminhada. Em especial à minha avó Marben, que sempre esteve pronta a me ajudar no que fosse necessário.

À minha namorada Sabrina por estar sempre disponível e disposta a me ajudar no que for preciso e também à sua família que sempre me acolhe e me trata como parte dela.

À república Bagudos, por ser minha casa durante oito anos, pelas muitas e muitas risadas, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas conversas, pelos conselhos, pela amizade e principalmente por serem essenciais em minha vida. Em especial à alguns que passei mais em convívio: Pastel de Pêlos, Enkanado, Tonto, Pateta, Zé Bronha, Alambique, Lambe, Kutuko, Mirna, Xaci, Agostinho, Kamão, Bonte e Dejair.

Ao professor Dr. José Ricardo de Arruda Miranda, meu orientador, à quem tenho grande admiração, por ter uma mente brilhante, por ter o dom de passar seus conhecimentos adiante e por ser um excelente empreendedor da vida acadêmica. Por me ensinar muito e principalmente por me fazer descobrir o gosto pela pesquisa. Agradeço também à sua esposa, professora Dra. Diana Rodrigues de Pina Miranda, por por fazer, junto ao professor José Ricardo, dos grupos de pesquisa Biomag e Lafar uma grande família.

À professora Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini, minha co-orientadora, por ter me introduzido em uma nova área do conhecimento científico, por ter uma excelente didática, por ter utilizado seu tempo para retirar minhas dúvidas e por sempre estar disposta a me ajudar no que fosse necessário.

À todos os integrantes dos laboratórios Biomag e Lafar, por fazerem deste ambiente de trabalho um lugar onde sinto prazer em estar.

Ao professor Dr. Andris Bakuzis, por fornecer as Nanopartículas Magnéticas utilizadas neste trabalho.

Ao professor Dr. Oswaldo Baffa, por ter disponibilizado os laboratórios da USP de Ribeirão Preto para a realização de parte dos experimentos desenvolvidos.

Ao Caio César Quini, ao Matheus Alvarez, ao Marcos Felipe Calabresi e ao Uilian de Andreis, por terem especial participação em minha vida acadêmica, por terem me ensinado, muitas vezes através de exemplos, como deve ser a postura e atitudes de um pesquisador.

Aos amigos Gustavo Morlin Moreto, Guilherme Soarez, Fábio Perez e Juliana Fernandes Matos por toda ajuda nos procedimentos experimentais e por cuidarem de meus animais de experimentação como se fossem seus.

Enfim, à todos que me ajudaram de alguma forma, direta ou indiretamente, meu muito obrigado!

Sumário

Lista de Figuras.....	9
Lista de Abreviações.....	13
Resumo	13
Abstract.....	15
1 Introdução	16
1.1 Biosusceptometria AC	16
1.2 Nanopartículas Magnéticas	18
1.3 Biodistribuição	19
1.4 Avaliações dinâmicas e perfusão.	21
1.5 Motivação e Alvo	23
2 Objetivos	26
3 Metodologia	27
3.1 Biosusceptometria AC mono-sensor.	27
3.2 Nanopartículas Magnéticas	29
3.3 Experimentação Animal.....	32
3.4 Biodistribuição	34
3.4.1 Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica	34
3.4.2 Biosusceptometria AC	35
3.5 Aquisição e quantificação dos dados	35
3.6 Forma de análise dos resultados.....	37
4 Resultados e discussão	38
4.1 Passagem das nanopartículas no coração do animal.....	38
4.2 Biodistribuição	46
4.3 Análises Cardiovasculares	53

5	Conclusão	63
6	Referências bibliográficas	66
	Apêndice	71
	Passagem das nanopartículas no coração do animal.....	71
	Biodistribuição.....	74
	Análises Cardiovasculares	75
	Óbitos.....	79

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma do funcionamento e aquisição de sinais do sistema BAC.	27
Figura 2 - Caracterização tangencial do sensor frente a uma amostra de 0,3ml de solução contendo MNPs.	28
Figura 3 - Caracterização axial do sensor frente a uma amostra de 0,3ml de solução contendo MNPs.	29
Figura 4 - Padrão de difração de raios X das MNPs estudadas. Fonte: Adaptado de QUINI et al, 2014.	30
Figura 5 - Imagem obtida de um microscópio de transmissão eletrônica (TEM). Fonte: Adaptado de QUINI, et al., 2014.	30
Figura 6 - Curva de magnetização das MNPs estudadas. Fonte: Adaptado de QUINI et al, 2014.	31
Figura 7 - Representação esquemática da metodologia empregada no experimento para aquisição da biossusceptometria de corrente alternada (BAC), eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial pulsátil (PAP).	33
Figura 8 - Exemplo das quantificações realizadas a partir do sinal da BAC: ΔI_{max} (intensidade máxima de sinal observada), I_f (Intensidade final do sinal), I_p (intensidade de sinal de permanência) e $T_{1/2}$ (tempo de circulação).	36
Figura 9 - Exemplo de ECG obtido na derivação D2 e do intervalo RR (demarcações em vermelho) para quantificação de arritmias.	36
Figura 10 - Exemplo de morfologia do sinal em administrações seriadas de MNPs.	38
Figura 11 - Exemplo de morfologia de sinal encontrada em uma administração de 0,9ml de solução contendo as MNPs.	39
Figura 12 - Intensidade máxima de sinal ($\Delta I_{m\acute{a}x}$) detectada pelo sistema BAC em cada administração de MNPs no grupo 1.	40
Figura 13 - Comparação da média da soma dos ΔI_{max} encontrados nas três administrações no grupo 1 aos valores de intensidade máxima encontrados em uma administração no grupo 1.	40
Figura 14 - Comparação da média da soma de intensidades finais de sinal encontrados nas três administrações no grupo 1 à média de intensidade final de sinal encontrados em uma administração no grupo 2.	41

Figura 15 - Comparação da média da soma das intensidades de sinal de permanência encontrados nas três administrações no grupo 1 à média de intensidade de sinal de permanência encontrados em uma administração no grupo 2.	42
Figura 16 - Médias de $T_{1/2}$ encontradas em cada administração no grupo 1. (**)p < 0,01 e (****)p < 0,0001.	43
Figura 17 - Comparação da média da soma dos $T_{1/2}$ encontrados nas três administrações no grupo 1 à média dos $T_{1/2}$ encontrados em uma administração no grupo 2. (****) p < 0,0001.	44
Figura 18 - Médias de TC encontradas em cada administração no grupo de animais do grupo 1.	45
Figura 19 - Contribuição percentual de cada órgão na soma dos sinais de todos os órgãos dos animais do grupo 1.	47
Figura 20 - Contribuição percentual de cada órgão na soma dos sinais de todos os órgãos dos animais do grupo 2.	48
Figura 21 - Correlação linear entre as técnicas BAC e EPR, utilizando as amostras de todos os órgãos do grupo 1.	49
Figura 22 - Correlação linear entre as técnicas BAC e EPR, utilizando as amostras de todos os órgãos do grupo 2.	49
Figura 23 - Método de concordância de Bland Altman entre as técnica BAC e EPR para o grupo 1.	50
Figura 24 - Método de concordância de Bland Altman entre as técnica BAC e EPR para o grupo 2.	50
Figura 25 - Comparação de biodistribuição entre os dois grupos estudados. (*)p < 0,05.	51
Figura 26 - Média da PAM sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs no grupo 1. (***)p<0,001.	53
Figura 27 - Média da PAM sem MNPs (basal) e após a administração de MNPs no grupo 2. (***)p<0,001.	54
Figura 28 – Porcentagem média de queda da PAM na primeira administração de MNPs nos animais do grupo um em comparação coma porcentagem de queda encontrada na administração de MNPs nos animais do grupo 2.	54
Figura 29 – Porcentagem médias de queda da PAM em cada uma das administrações de MNPs no grupo 1.	55

Figura 30 - Médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima observada em cada uma das administrações no grupo 1.(****) $p<0,0001$	56
Figura 31 - Médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima observada em cada grupo.....	57
Figura 32 - Médias dos tempos de retorno da PAM aos níveis pré-administração em cada uma das administrações no grupo 1.(****) $p<0,0001$	57
Figura 33 - Médias dos tempos de recuperação da hipotensão máxima observada em cada grupo.....	58
Figura 34 - Média da FC sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs no grupo 1.	59
Figura 35 - Média de FC sem MNPs (basal) e após a administração de 0,9ml de MNPs no grupo 2.	59
Figura 36 - Média da porcentagem de alteração da FC em cada uma das administrações de MNPs no grupo 1.	60
Figura 37 - Arritmias cardíacas no período pré administração e após a primeira administração de MNPs nos animais do grupo 1.	61
Figura 38 - Arritmias cardíacas no período pré administração e após a administração de MNPs nos animais do grupo 2.	61
Figura 39 - Arritmias cardíacas encontradas em cada administração de MNPs nos animais do grupo 1.....	62

Lista de Abreviações

BAC – Biosusceptometria AC

MNPs – Nanopartículas Magnéticas (*Magnetic Nanoparticles*)

SARs – Relação entre Estrutura e Atividade (*Structure-Activity Relationships*)

EPR – Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (*Electron Paramagnetic Resonance*)

MRI – Imageamento por Ressonância Magnética (*Magnetic Resonance Imaging*)

$T_{1/2}$ – Tempo de Meia Vida

TC – Tempo de Chegada

FWHM – Meia Largura da Banda (*Full Width at Half Maximum*)

PAP – Pressão Arterial Pulsátil

ECG – Eletrocardiograma

ESR – Ressonância de Spin Eletrônico (*Electron Spin Resonance*)

$\Delta I_{\max}$ – Variação de Intensidade Máxima de Sinal

I_f – Intensidade Final de Sinal

I_p – Intensidade de Sinal de Permanência

PAM – Pressão Arterial Média

PA – Pressão Arterial

FC – Frequência Cardíaca

BPM – Batimento por Minuto

Resumo

As técnicas biomagnéticas possibilitam o estudo de diversos parâmetros fisiológicos através da detecção de campos magnéticos gerados por correntes biológicas ou por marcadores/traçadores magnéticos. Uma das técnicas utilizadas dentro desta vertente é a Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC). A técnica utiliza um sistema gradiométrico de bobinas para monitorar posição e concentração de materiais magnéticos em sistemas biológicos. A partir do monitoramento realizado pelo sistema, é possível obter dados relacionados com as propriedades biológicas locais e estabelecer parâmetros mecânico-fisiológicos, principalmente do trato gastrointestinal, como esvaziamento e atividade de contração gástrica. A proposta deste trabalho é inédita e consiste na aplicação do sistema BAC, associado à nanopartículas magnéticas utilizadas como traçadores, a fim de, futuramente, disponibilizar uma nova ferramenta para estudos de caracterização pré-clínica de nanopartículas magnéticas. Foram realizados experimentos com ratos para a quantificação do tempo de meia vida das nanopartículas magnéticas em intervalos de tempo pré definidos, além do tempo de chegada das partículas no coração dos animais, bem como sua biodistribuição. Como testes adicionais, foram realizadas quantificações de alterações em parâmetros cardiovasculares sobre a administração endovenosa das nanopartículas magnéticas, já que esses parâmetros cardiovasculares influenciam diretamente no tempo de meia vida e biodistribuição do material. O sistema demonstrou bom desempenho em todos os testes aplicados, apresentando excelente reprodutibilidade, sensibilidade e resolução temporal. Os resultados sugerem a utilização da BAC como método de avaliação de parâmetros de caracterização pré-clínica de nanopartículas magnéticas em organismos vivos, em avaliações de biodistribuição e tempo de meia vida das nanopartículas na corrente sanguínea. Foram encontradas alterações transitórias na pressão arterial média e frequência cardíaca sobre a administração endovenosa das nanopartículas magnéticas utilizadas. Este trabalho contempla o desenvolvimento e caracterização de nova instrumentação física de baixo custo que subsidie aplicações na pesquisa do sistema circulatório em pequenos animais e novas aplicações de materiais nano estruturados em angiologia, o que proporcionará futuras inovações em instrumentação biomédica, farmacologia, ciência biomédica, fisiologia e na clínica médica.

Palavras-chave: Biosusceptometria AC, Biomagnetismo, Nanopartículas Magnéticas, Biodistribuição, Fisiologia Cardiovascular e Instrumentação Biomédica.

Abstract

In the Biomagnetic research field, several methods have reported to study physiological parameters through the detection of magnetic fields generated by biological electrical currents or magnetic marker/tracers. Among such techniques, the Alternating Current Biosusceptometry (AC Biosusceptometry or ACB) system has been developed and refined with the main purpose of detecting and monitoring magnetic materials in biological systems (mainly in the gastrointestinal tract so far). With a pair of gradiometric pickup coils, the ACB system is able to obtain data related to local biological properties and also to study mechanical and physiological parameters, such as gastric emptying and contraction activity. This work presents an unprecedented study that applies the ACB system, associated to magnetic nanoparticles, as a new tool for preclinical characterization of magnetic nanoparticles. *In vivo* Experiments were performed in rat models to quantify the magnetic nanoparticles half-life in predefined time intervals, the particles arrival time in the animals heart and also the nanoparticles biodistribution. As an additional test, cardiovascular parameters were acquired during the particle intravenous administration, since these parameters directly influence the material half-life and biodistribution. The system presented good performance in all tests, with excellent reproducibility, sensitivity and temporal resolution. Also, these results suggest the ACB using as valuable evaluation method for magnetic nanoparticles preclinical characterization, in parameters as biodistribution and half-life in the bloodstream, since transient changes in mean arterial pressure and heart rate were found due to the magnetic nanoparticles intravenous administration. This work includes the development and characterization of a new low cost physics instrumentation, to subsidize circulatory system research, in small animals, and new nanostructured materials applications in Angiology, which might provide future innovations in biomedical instrumentation, pharmacology, biomedical science, physiology and in clinical medicine.

Keywords: AC Biosusceptometry, Biomagnetism, Magnetic Nanoparticles, Biodistribution, Cardiovascular Physiology and Biomedical Instrumentation.

Introdução

1.1 Biosusceptometria AC

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica bem estabelecida na área de gastroenterologia e seus princípios de funcionamento são descritos pelo eletromagnetismo clássico. Em relação a outros sistemas já estabelecidos, a BAC apresenta vantagens como o baixo custo, versatilidade, baixíssima invasividade, portabilidade e ausência de radiação ionizante.

Desde suas primeiras aplicações na década de 50 e 60, os estudos envolvendo BAC são focados, principalmente, em avaliação de parâmetros envolvendo o trato gastrointestinal de humanos (WENGER et al., 1961; WENGER et al., 1957), (BENMAIR et al., 1977a; BENMAIR et al., 1977b). Nesses estudos iniciais a técnica utilizada necessitava de grande quantidade de material magnético e o sistema tinha dimensões que limitavam suas aplicações. Na década de 90 o sistema passou por uma significativa modificação geométrica, eletrônica e instrumental, que melhorou a relação sinal/ruído do sistema, resultando no aumento da sensibilidade, elevando a técnica a um novo nível, além de adquirir características interessantes como portabilidade, e versatilidade (MIRANDA et al., 1992). Desde o surgimento dessa técnica até os dias atuais, muitas aplicações e inovações instrumentais foram propostas (Tabela 1).

Tabela 1 - Aplicações da BAC, autores e espécie utilizada.

Aplicação	Referência Bibliográfica	Espécie utilizada
Motilidade gástrica	(WENGER et al., 1957)	Humano
	(WENGER et al., 1961)	Humano
	(MIRANDA et al., 1997)	Humano
	(MORAES et al., 2003)	Cão
	(AMERICO et al., 2007)	Humano
	(ANDREIS et al., 2008)	Cão
	(AGOSTINHO et al., 2010a)	Rato
Trânsito gastrintestinal (orocecal, faringeano e esofaríngeano)	(BENMAIR et al., 1977b)	Humano
	(OLIVEIRA et al., 1992)	Humano
	(BAFFA et al., 1995)	Humano
	(OLIVEIRA et al., 1996)	Humano
	(DAGHASTANLI et al., 1998)	Humano
	(MIQUELIN et al., 2001)	Humano
	(QUINI et al., 2012)	Rato
Esvaziamento gástrico	(BENMAIR et al., 1977a)	Humano
	(MIRANDA et al., 1992)	Humano
	(QUINI et al., 2012)	Rato
Farmacotécnica	(CORA et al., 2003)	Humano
	(CORA et al., 2005a)	Humano
	(CORA et al., 2005b)	Artigo de revisão
	(CORA et al., 2006)	Humano
	(CORA et al., 2008)	<i>In vitro</i>
	(CORA et al., 2010)	Humano
Inovações instrumentais	(MOREIRA et al., 2000)	<i>In vitro</i>
	(CHUBACI, 2003)	<i>In vitro</i>
	(PAIXAO et al., 2007)	<i>In vitro</i>
	(AGOSTINHO et al., 2008)	<i>In vitro</i>
	(AGOSTINHO et al., 2009)	<i>In vitro</i>
	(AGOSTINHO et al., 2010b)	Rato
	(PAIXAO et al., 2010)	<i>In vitro</i>
	(FONSECA, 2011)	<i>In vitro</i>
Perfusão de órgãos	(QUINI et al., 2014)	Rato

Durante o desenvolvimento, aprimoramento e aplicações da técnica até 2012, eram utilizadas partículas de material ferromagnético (ferrita de manganês) como material traçador. As partículas apresentavam tamanho na ordem de 50 a 100 μm e não eram absorvidas pelo organismo, sendo excretadas via fezes. Quini et al. (2012) propôs a aplicação de nanopartículas magnéticas (MNPs – do inglês *Magnetic nanoparticles*) para avaliar trânsito e esvaziamento de líquidos, empregando fluidos superparamagnéticos, o que possibilitou o surgimento de uma nova linha de pesquisa, baseada no monitoramento dessas nanopartículas em órgãos e tecidos, que não era possível até então devido às limitações dimensionais do material e das propriedades magnéticas (susceptibilidade) (QUINI et al., 2012).

1.2 Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas magnéticas e ferrofluidos são materiais que possuem grande versatilidade (PANKHURST et al., 2003). Seu tamanho reduzido aliado às suas propriedades magnéticas permite que estas estruturas interajam de várias formas diferentes dentro de um sistema biológico. É possível realizar a marcação e a separação de estruturas de interesse. Neste caso, a marcação através de MNPs é feita modificando quimicamente o revestimento destas partículas, através de moléculas biocompatíveis específicas (LUBBE et al., 2001). Desta forma, as MNPs podem se ligar à diversas substâncias ou órgãos alvos, como células, proteínas ou ácidos nucleicos (BERGEMANN et al., 1999), sendo possível separar essas células (alvos) de interesse do todo, mediante a aplicação de um campo magnético sobre essas MNPs.

Terapias celulares com células tronco também já utilizam MNPs como marcador, associado à técnicas de ressonância magnética ou microscopia, com o intuito de estudar a chegada e alocação das células tronco em seu alvo (BULTE et al., 2001; LEWIN et al., 2000).

Também é possível fazer a distribuição de fármacos guiada através de um campo magnético. Utilizando MNPs biocompatíveis ligadas a um fármaco, pode-se guiá-lo até a região de interesse através de um campo magnético externo aumentando a concentração do material na região de interesse, onde a droga se dissociará do carreador magnético dando início a sua ação tecidual. Desta forma obtém-se alta precisão e seletividade sobre os tecidos afetados pelos fármacos associados às nanoestruturas (HAFELI et al., 2005). Esta técnica é também usada em quimioterapia (KETTERING

et al., 2007), com o objetivo de aumentar a eficiência, pois os agentes quimioterápicos possuem baixa seletividade para os órgãos de interesse, o que pode causar dano, não só as células tumorais, mas também as células saudáveis próximas ao tumor. Assim, uma forma menos invasiva e mais seletiva de minimizar esses efeitos indesejados é utilizando partículas nano estruturadas associadas ao fármaco (CHERTOK et al., 2008).

Outra aplicação destes materiais magnéticos no tratamento de células cancerígenas é através da hipertermia. O método consiste em guiar as MNPs até o tecido alvo e posteriormente, utilizando um campo magnético de frequência específica, provocar o aquecimento destas partículas por tempo e temperatura determinados, causando desde respostas imunológicas até a morte celular (BRANQUINHO et al., 2014; CARRIAO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013; SCHALLER et al., 2008). É possível aplicar a técnica não só no tratamento de tumores, mas também às áreas de dermatologia e oftalmologia.

As MNPs também podem ser utilizadas como contrastes na ressonância magnética, pois em relação aos outros contrastes usuais apresenta alta susceptibilidade magnética e uma meia vida mais longa na corrente sanguínea (GOODWILL et al., 2009; WAGNER et al., 2002; WUNDERBALDINGER et al., 2002b). Além disso, as MNPs ainda podem ser utilizadas no controle do crescimento de células em determinados substratos (LOICHEN e HARTMANN, 2009).

Estas estruturas apresentam uma versatilidade considerável graças, principalmente, às suas características dimensionais, que podem variar de 4 até 100 nm. Desta forma elas podem ser usadas para estudar e/ou interagir com praticamente qualquer estrutura biológica de interesse.

1.3 Biodistribuição

O destino das MNPs é uma das principais preocupações quando estas são aplicadas em experimentos *in vivo* e procedimentos clínicos. Características como carga superficial, potencial Zeta (afinidade eletrônica), tamanho, revestimento e núcleo das nanopartículas possibilitam diferentes alvos e destinos dentro de um sistema biológico. Estudos de caracterização pré-clínica das MNPs, que tem como objetivo elucidar as relações estrutura-atividade (SARs – do inglês *structure-activity relationships*), são de grande importância na área e ultimamente têm recebido grande visibilidade na comunidade científica (SUN et al., 2008).

A carga superficial e o potencial Zeta das MNPs são de grande importância na biodistribuição. Essas grandezas conferem às MNPs características de afinidade ou repulsão a certos tecidos, órgãos ou sistemas. O potencial Zeta depende da carga superficial da nanopartícula, da carga do revestimento utilizado e do meio em que ela está dispersa. Quanto maior o potencial Zeta, maior a estabilidade das MNPs na solução ou dispersão em que elas se encontram, conferindo maior resistência à formação de agregados (BAKUZIS et al., 2013; BAKUZIS et al., 1999). Então, dependendo da carga superficial e do potencial Zeta, pode existir formação de agregados, o que leva a uma variação no tamanho das MNPs, e consequente alteração dos locais de retenção, vias de metabolização e excreção. Além da formação de agregados, não pode-se desconsiderar que o potencial Zeta influencia diretamente na afinidade das MNPs com tecidos.

Cada tecido ou órgão possui suas características morfofisiológicas, que estão intimamente ligadas às suas funções. A relação entre estas características, tamanho das MNPs e a biodistribuição é alvo de vários estudos. Por exemplo, nanopartículas maiores do que 200nm são sequestradas por ação fagocitária de células presentes no baço (CHEN e WEISS, 1973), enquanto que nanopartículas menores do que 5.5 nm são rapidamente retiradas do sangue via depuração renal (CHOI et al., 2007; SUN et al., 2008).

Outro fator que influencia na biodistribuição é a condição fisiológica do animal estudado. Em condições fisiológicas alteradas como a presença de processos inflamatórios, infecciosos, tumores, ou mesmo quando houve a retirada total ou parcial de um órgão (paciente nefrectomizado, por exemplo), a biodistribuição é alterada devido ao efeito de aumento de permeabilidade e retenção. Esse efeito é causado pelo fato do tecido afetado apresentar uma permeabilidade vascular aumentada, o que proporciona a fuga das nanopartículas da vasculatura para o parênquima tecidual, acarretando maior acúmulo de nanopartículas onde a princípio não existiria (COLE et al., 2011; SUN et al., 2008).

Até o presente momento poucas técnicas são utilizadas como método de avaliação da biodistribuição de MNPs em sistemas biológicos. Uma técnica muito utilizada é a relaxometria, que se baseia na observação dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) das partículas, quando estas estão sob influência de um campo magnético excitante pulsado. Essa técnica necessita de amostras, retiradas através de biópsias ou da coleta do órgão estudado, devidamente preparadas para o procedimento

de aquisição dos sinais referentes à quantidade de material nanomagnético presente na amostra, o que torna essa técnica invasiva, de alto custo, além de se mostrar complexa e de difícil manuseio (KRAUSE et al., 2007; TAUPITZ et al., 2000; WAGNER et al., 2002).

A Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR – do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*) também é utilizada como método de avaliação de biodistribuição. Porém essa técnica necessita de procedimentos de calibração frente à amostra a ser estudada, é uma técnica complexa e de alto custo, além de apresentar ruídos no sinal detectado em amostra com pequenas quantidades de material magnético, dificultando a quantificação de depósito de material nanomagnético em órgãos com pouca ou nenhuma retenção (CHERTOK et al., 2010; GAMARRA et al., 2008).

Outra técnica bem estabelecida e amplamente utilizada é a marcação das MNPs com material radioativo e a aferição da atividade radioativa em amostras retiradas dos órgãos estudados. Por fazer uso de radiação ionizante, esta técnica se mostra invasiva e de alto custo, além de necessitar de pós processamento dos dados devido ao decaimento radioativo ao longo do tempo, o que influencia diretamente nos valores obtidos (WUNDERBALDINGER et al., 2002a). Salienta-se que a marcação deve ser um fator importante, pois se a ligação entre as MNPs e o marcador, por algum motivo, se desfazer, a aferição final pode ser prejudicada uma vez que a leitura se baseia no marcador radioativo e não nas MNPs.

1.4 Avaliações dinâmicas e perfusão.

Muitos métodos de avaliações de parâmetros dinâmicos, como o fluxo sanguíneo e perfusão, foram aplicados ao longo dos anos. Os principais são baseados em diferentes fenômenos físicos e fisiológicos como mudanças na impedância elétrica, condutância ótica, traçadores detectáveis (de calor, de tingimento, radioativos, químicos e coloridos), mudança de temperatura na superfície do tecido devido ao grau de vascularização, ressonância magnética e efeito Doppler. Algumas dessas técnicas não são aceitas como procedimento padrão ou apresentam desempenho inferior, enquanto as já estabelecidas apresentam uma série de erros associados.

Uma forma de se obter informações sobre parâmetros dinâmicos, é monitorar traçadores no sistema circulatório. Existem diferentes tipos de traçadores e detectores empregados nessa vertente, como: traçadores radioativos (KRISTENSEN e

WADSKOV, 1977; SEJRSEN, 1971), gasosos (KETY, 1951), químicos (ECKENHOFF et al., 1947), de calor (OLSON et al., 2010) além de microesferas coloridas ou fluorescentes (BERNARD et al., 2000; RUDOLPH e HEYMANN, 1967). Essas técnicas possuem limitações como na termodiluição, que possui baixa resolução temporal. As que empregam radiação ionizante implicam em incidência de dose no paciente e alto custo. No caso dos métodos que envolvem traçadores químicos e gasosos, é necessário retirar amostras de sangue do paciente em intervalos bem definidos, o que causa um desconforto considerável e imprecisão nas medidas. Nas técnicas onde esse monitoramento é realizado por microesferas, o procedimento é realizado de forma consideravelmente invasiva, pois para se obter a localização e quantificação do depósito desse material, são realizadas análises histológicas de amostras de tecido do paciente, não podendo descartar o fato de que as análises utilizadas para realizar a estimativa são subjetivas e apresentam uma série de erros associados a essa subjetividade.

Outra técnica de aferições sobre a dinâmica do sangue são os medidores eletromagnéticos de fluxo, que aplicam um campo magnético em um vaso sanguíneo e detectam uma força eletromotriz gerada perpendicularmente a esse campo, proporcional à velocidade do sangue no vaso (CANNON et al., 1960). Porém essa técnica se mostra problemática na parte da calibração da constante de proporcionalidade entre o campo detectado e a velocidade do sangue. Além de necessitar da exposição do vaso por meios cirúrgicos em alguns casos (MARCUS et al., 1987; TANAKA et al., 1974).

A avaliação da dinâmica da corrente sanguínea através de Imageamento por Ressonância Magnética (MRI – do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) também é amplamente estudada, sendo que algumas das técnicas de MRI utilizam contraste magnético (micro e nanopartículas magnéticas) (BELLIVEAU et al., 1990; ULMER et al., 2010; WAGNER et al., 2002). A técnica de MRI apresenta efeitos indesejáveis quando aplicada para aferição dinâmica, pois o movimento afeta a intensidade do sinal que forma a imagem, em muitos aspectos não-lineares que dependem da técnica específica utilizada, do vaso em particular e da geometria do fluxo sanguíneo local. Além disso, é necessário considerar o movimento do sangue pelos vasos, ou seja, a parte do sangue, que está sob efeito do campo magnético externo aplicado, irá se deslocar e será detectado um volume que não obteve magnetização prévia, implicando

em um sinal de baixa intensidade em fluxos rápidos e alta intensidade em fluxos lentos (AXEL, 1984).

Um segmento do radiodiagnóstico, a angiografia, utiliza a incidência de radiação ionizante (raios-X – Fluoróscopos) e um contraste radiopaco para obter imagens dos vasos sanguíneos, ou uma parte do sistema circulatório. Por fazer uso de radiação ionizante e catéteres, a angiografia se mostra muito invasiva e de alto custo, além de ser desaconselhada a aplicação da técnica em alguns tipos de pacientes, grávidas e recém nascidos, por exemplo (OVITT et al., 1980).

O efeito Doppler é o fenômeno físico mais utilizado para aquisição de informações sobre o fluxo sanguíneo, sendo o padrão ouro em diversos procedimentos clínicos. Existem dois tipos principais de aplicações do efeito Doppler, o que utiliza ultrassom (GILL, 1985) e o que utiliza luz (laser) (RIVA et al., 1972). Os dois métodos se baseiam na idéia de que emitindo uma onda (mecânica ou eletromagnética) em um objeto em movimento, ela retorna com frequência alterada, sendo que a alteração é proporcional à velocidade do objeto. Devido ao uso da frequência de retorno da onda emitida, as instrumentações que fazem uso de luz tem uma baixíssima sensibilidade em velocidades baixas, pois para alterar a frequência de ondas eletromagnéticas são necessárias velocidades muito grandes. Quando empregado em vasos superficiais ou de média profundidade, as técnicas por efeito Doppler se mostram vantajosas por não serem invasivas e obterem bons resultados, porém em vasos mais profundos é necessário o uso de cateteres, a exposição do vaso ou a própria introdução da sonda no corpo do paciente (MARCUS et al., 1987), devido à baixa penetração destas bandas de energia no tecido biológico e questões de resolução. Outra desvantagem da técnica é na prática, pois se o ângulo de acoplamento da sonda no vaso for diferente de 90°, o valor medido não corresponderá com o real (GILL, 1985).

1.5 Motivação e Alvo

Nanopartículas magnéticas são materiais que têm tido grande visibilidade pela comunidade científica devido às suas características que lhe conferem um potencial teranóstico, ou seja, capaz de associar diagnóstico a terapia no mesmo método.

A partir da proposição do uso desses materiais nanoestruturados na clínica médica, surge a necessidade de caracterizações pré-clínicas, e para essa finalidade,

surge também a necessidade de tecnologias capazes de interagir com essas estruturas dentro de organismos biológicos de forma minimamente invasiva.

Dentro deste contexto, o sistema BAC se mostra de extrema relevância, já que atua como um detector de materiais magnéticos, empregados como marcadores ou traçadores, em estudos fisiológicos.

Os métodos utilizados até o momento em estudos de caracterizações pré-clínica de MNPs, como relaxometria, EPR, MRI, entre outros citados anteriormente, apresentam uma série de inviabilidades, como altos custos, difícil manuseio e imobilidade. Além disso, entre estes métodos citados, a única técnica capaz de realizar testes dinâmicos é a Ressonância Magnética Funcional, que apesar de possuir boa resolução espacial e temporal, é uma técnica de custo elevado que depende de um ambiente controlado, o que dificulta sua associação com outros sistemas, limitando as possíveis aplicações terapêuticas das MNPs. Vale ressaltar, ainda, que a Ressonância Magnética Funcional é pouco aplicada em regiões como o abdômen e tórax, visto que o movimento de fluidos e estruturas dentro dessas cavidades gera uma série de artefatos na imagem e sua resolução temporal nesses casos é limitada (de dois a três frames por segundo) (MARCIANI, 2011). A Biosusceptometria AC fornece uma alternativa versátil de baixo custo para determinação de posição e concentração de nanopartículas magnéticas em tempo real além de que nenhuma das técnicas citadas nos itens anteriores é capaz de realizar aquisições dinâmicas, e em tempo real, do deslocamento de MNPs no organismo de pequenos animais vivos.

O sistema BAC também é capaz de realizar aferições sobre o destino final das MNPs no organismo do animal, o que permite estudos de biodistribuição destes materiais magnéticos. Essas características lhe conferem caráter único, onde, com um mesmo sistema, pode-se realizar avaliações fisiológicas de órgãos e sistemas, através do monitoramento dinâmico das MNPs, e em seguida mapear o destino final das MNPs, em situações fisiológicas normais e/ou alteradas.

Extrapolando as possibilidades de associação do sistema BAC com MNPs, pode-se, ainda, imaginar soluções para diversos problemas encontrados na clínica médica, como por exemplo o uso de radiação ionizante em angiografias e baixa resolução temporal em MRI.

Desta forma, a busca por novas instrumentações para avaliação de parâmetros relacionados à circulação sanguínea e perfusão de órgãos e sistemas se tornam

importantes, principalmente envolvendo métodos não invasivos, de baixo custo e livre de radiação ionizante.

O presente trabalho se destina a avaliar o potencial do sistema BAC para realizar o monitoramento de traçadores magnéticos nanoestruturados na circulação sanguínea e para realizar o mapeamento do destino final das MNPs dentro do organismo de pequenos animais, visando à utilização futura do sistema BAC como uma nova ferramenta de caracterizações pré-clínicas de MNPs e também como ferramenta de estudos fisiológicos empregando pequenos animais.

2 Objetivos

Em termos gerais, o objetivo deste trabalho foi propor o sistema BAC como possível nova ferramenta para estudos de caracterização pré-clínica e biodistribuição de MNPs.

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliação da reprodutibilidade dos sinais detectados pelo sistema BAC em administrações únicas e seriadas de MNPs por via endovenosa;
- Avaliação do desempenho da BAC em aferições dinâmicas referentes ao tempo de meia vida ($T_{1/2}$) e tempo de chegada (TC) das MNPs no coração;
- Avaliação do desempenho da BAC frente ao método de EPR em quantificações de parâmetros biodistributivos de MNPs;
- Avaliação da administração endovenosa de MNPs sobre parâmetros cardiovasculares tais como pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e perfil eletrocardiográfico.

3 Metodologia

3.1 Bioassusceptometria AC mono-sensor.

Este sistema trabalha como um transformador duplo de fluxo magnético, no qual o par de bobinas (excitação/detecção), mais distante do material magnético, atua como referência. Quando não há material magnético próximo ao sistema de medida, a resposta é minimizada. Ao aproximar o material magnético do par de detecção, ocorre um desbalanceamento no fluxo magnético do sistema gradiométrico e observa-se um aumento no sinal elétrico obtido. Esse sinal elétrico pode ser medido, digitalizado e registrado online com o auxílio de um amplificador sensível à fase (*Lock-in*), uma placa analógico/digital e um computador, como mostra a figura 1. Cada par de bobinas é separado por uma distância suficiente para minimizar a interferência entre elas (linhas de base), estando as bobinas detectoras dispostas em uma configuração gradiométrica de primeira ordem, ou seja, dispostas em sentidos contrários de modo que os fluxos magnéticos concatenados em cada bobina detectora sejam subtraídos, eliminando os ruídos ambientais e tornando-as mais sensíveis (CORA et al., 2005b).

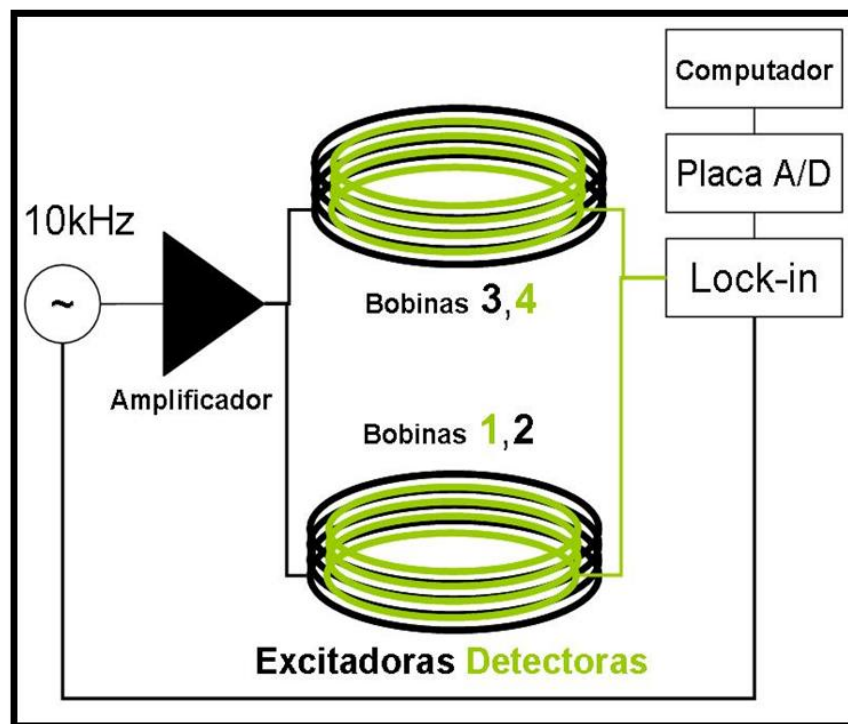


Figura 1 - Fluxograma do funcionamento e aquisição de sinais do sistema BAC.

Materiais magnéticos são agrupados de acordo com a sua forma de apresentação em: traçadores magnéticos (partículas de material magnético dispersas em um meio) e marcadores (partículas contidas em uma forma farmacêutica sólida – comprimidos ou cápsulas (CORA et al., 2003)). Além disso, fragmentos maiores como sólidos de ferrita podem, também, serem considerados excelentes marcadores magnéticos.

Foi utilizado um sistema BAC mono-sensor de 2,8 cm de diâmetro que apresentou uma resolução espacial de 1,70cm, aferido via meia largura da banda (FWHM – do inglês *Full width at half maximum*), frente a uma amostra contendo 0,3 ml de MNPs, como mostra a figura 2:

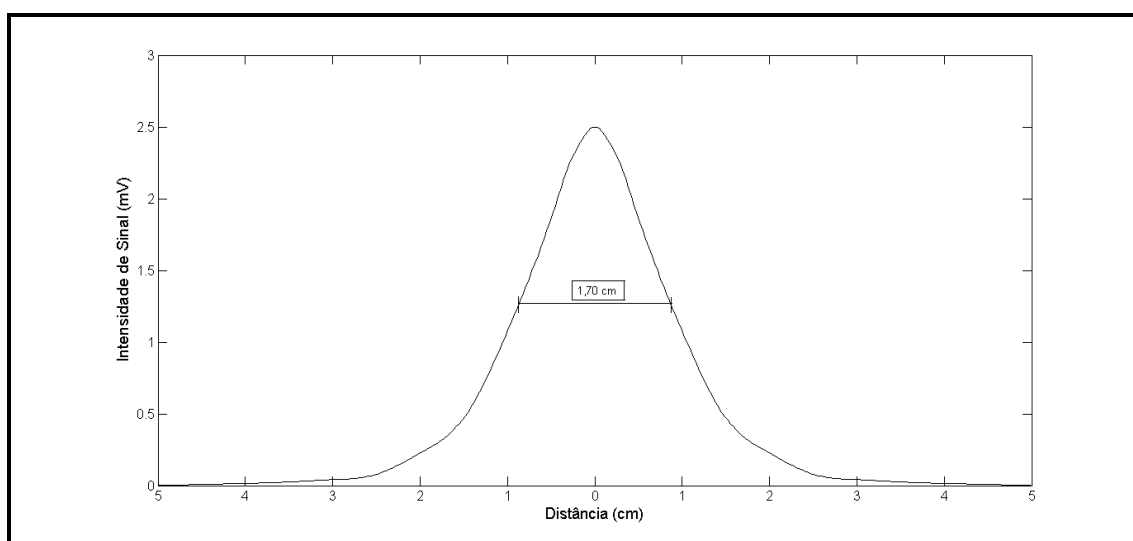


Figura 2 - Caracterização tangencial do sensor frente a uma amostra de 0,3ml de solução contendo MNPs.

O sensor apresentou um perfil de decaimento de resposta conforme o teste de caracterização axial apresentado na figura 3.

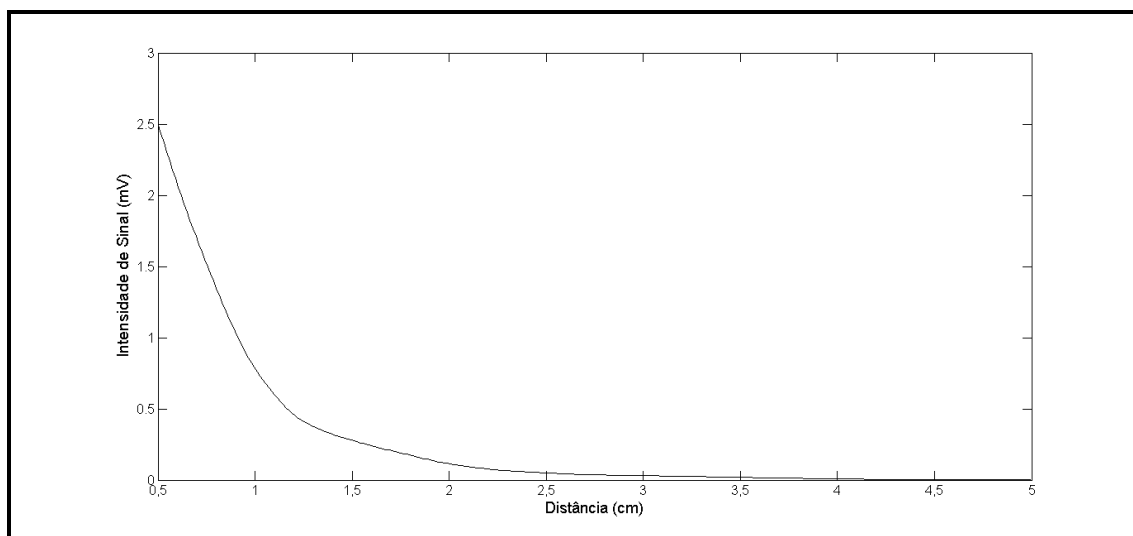


Figura 3 - Caracterização axial do sensor frente a uma amostra de 0,3ml de solução contendo MNPs.

3.2 Nanopartículas Magnéticas

Foram utilizadas para a administração endovenosa, MNPs de ferrita de manganês recobertas com ácido cítrico ($\text{Ci-MnFe}_2\text{O}_4$) e sintetizadas por método de coprecipitação descrito anteriormente (BRANQUINHO et al., 2013). As MNPs foram fornecidas pelo laboratório de Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo do Departamento de Física da Universidade Federal de Goiânia, sob orientação do Prof. Dr. Andris Bakuzis. A figura 4 apresenta o padrão de difração de raios X, e os dados obtidos constataram um diâmetro médio de cristalito de 16,7 nm (utilizando a relação de Scherrer).

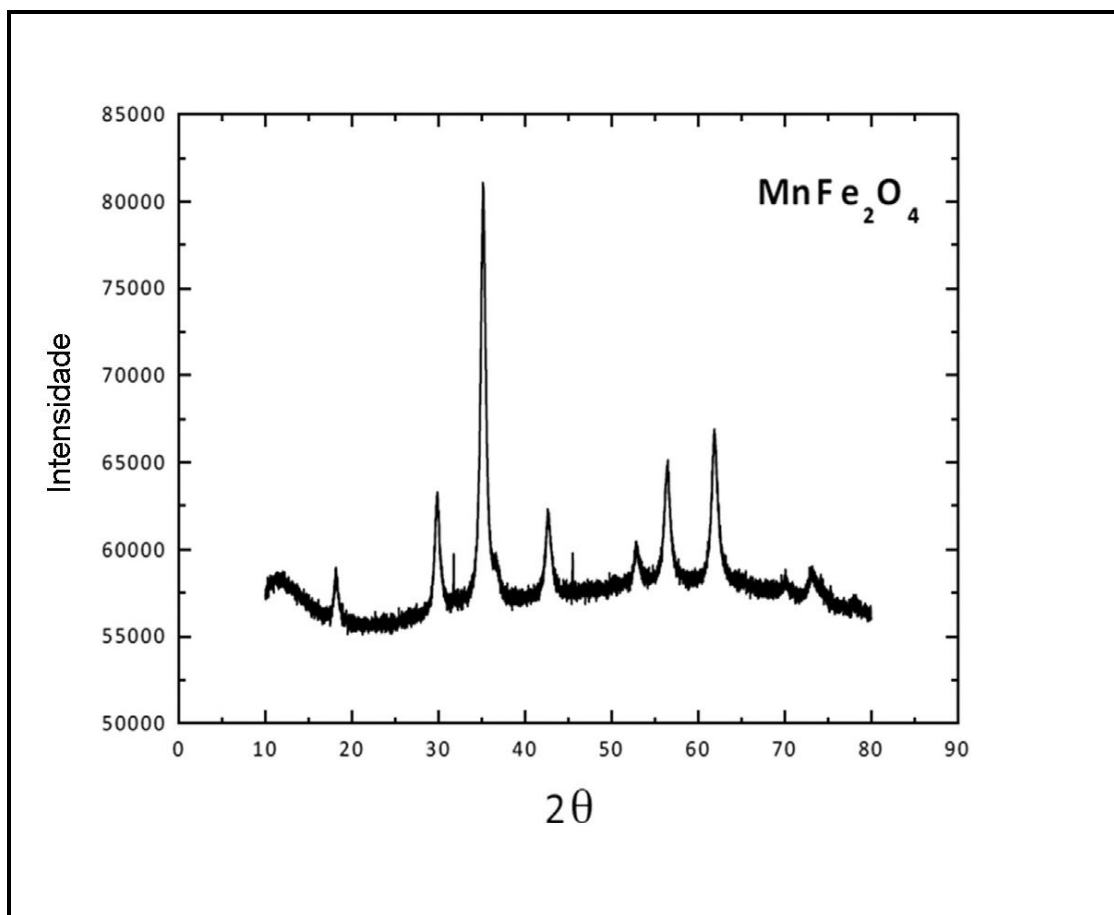


Figura 4 - Padrão de difração de raios X das MNPs estudadas. Fonte: Adaptado de QUINI et al., 2014.

A distribuição dimensional das MNPs também foi aferida via imagens obtidas de um microscópio de transmissão eletrônica da marca JOEL modelo JEM-2100 operando a 200 kV, como mostra a figura 5, e encontrou um tamanho médio da partícula de 13 ± 4 nm.

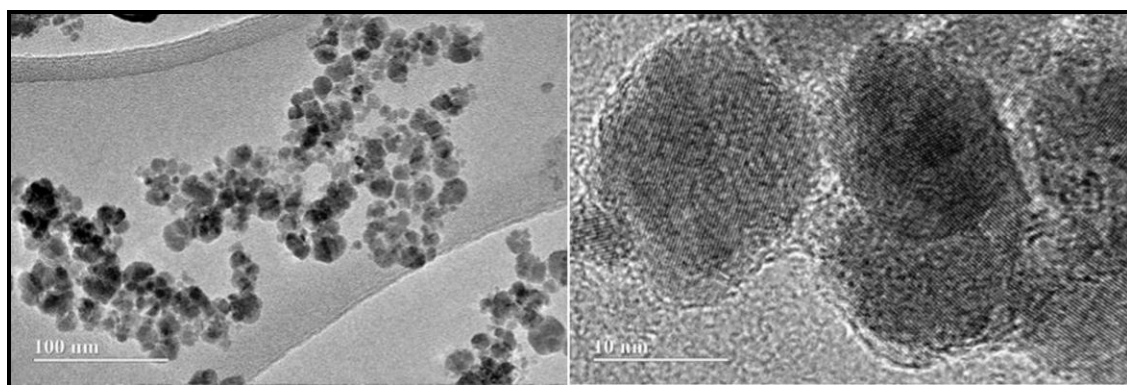


Figura 5 - Imagem obtida de um microscópio de transmissão eletrônica (TEM). Fonte: Adaptado de QUINI, et al., 2014.

As MNPs apresentaram saturação de magnetização de 264 emu/cm^3 (58 emu/g) como observado na figura 6:

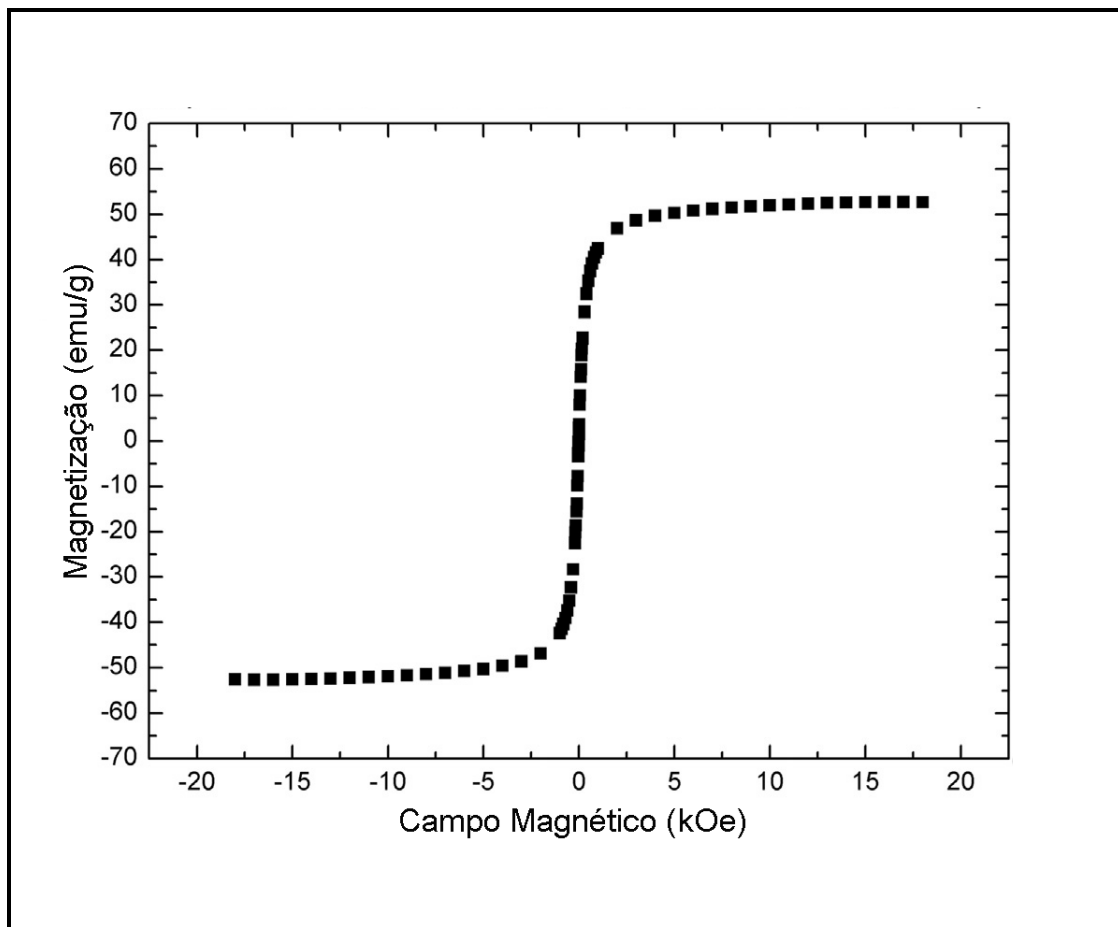


Figura 6 - Curva de magnetização das MNPs estudadas. Fonte: Adaptado de QUINI et al., 2014.

O potencial Zeta das MNPs foi descrito anteriormente (NUNES et al., 2014) e apresentou valores de aproximadamente -42 mV em $\text{pH } 7,4$. A ferrita de manganês foi escolhida como material traçador devido à sua alta susceptibilidade magnética, com o objetivo de otimizar o sistema de detecção (LEE et al., 2007).

As MNPs se encontravam dispersas em solução fisiológica (solução salina 0,9%) numa concentração de 23 mg/ml ($1,7 \times 10^{15}$ partículas/ml). As administrações endovenosas de MNPs foram feitas utilizando um volume de suspensão de $0,3 \text{ mL}$ (protocolo de 3 administrações seriadas) ou $0,9 \text{ mL}$ (protocolo de uma única administração) que passou por processo de 12 minutos de sonicação (sonicador Thornton modelo T50) e filtração (FilterPro modelo SPE 0445).

3.3 Experimentação Animal

Para a realização deste experimento foram utilizados 12 ratos adultos (*Rattus norvegicus albinus* – linhagem Wistar), machos, com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério Anilab – Paulínia - SP, mantidos em condições e local adequado (protocolo comitê de ética em experimentação animal CEUA - IBB nº 649). Outros 5 animais foram empregados em uma situação em que as MNPs não passaram por pré-tratamento de sonicação e filtração, a fim de estudar os efeitos biológicos das MNPs sem pré-tratamento quando administradas via endovenosa em ratos, porém como esses dados não fazem parte dos objetivos principais deste trabalho, estão expostos no Apêndice 1.

Os animais foram anestesiados com uretano (99% - 1,5 mg/kg) e submetidos à cirurgia de canulação de veia e artéria femoral para as administrações endovenosas das MNPs e registro de pressão arterial pulsátil (PAP) respectivamente.

As cânulas utilizadas foram confeccionadas e doadas pelo Laboratório de Terapia Celular e Doenças Cardiovasculares do Departamento de Fisiologia UNESP-IBB sob coordenação da Profa. Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini. Foram utilizados aproximadamente 5 cm de tubo PE-10 soldado a 10 cm de tubo PE-50 para canulação de artéria femoral e aproximadamente 2 cm de tubo PE-50 soldado a 10 cm de tubo PE-10 para canulação de veia femoral.

Após os animais serem anestesiados, foi feita uma incisão no membro inferior esquerdo do animal para a exposição da veia e da artéria femoral. Após esse procedimento, a cânula, previamente preenchida com NaCl 0,9% contendo 500 UI/mL de Heparina para evitar a formação de coágulos, foi inserida, por meio de um pequeno pique, na artéria femoral e conectada ao transdutor de registro de PAP (transdutor Biopac Systems modelo TDSD 104^a). Foi realizado o mesmo procedimento de canulação para a veia, e o acesso venoso permaneceu ocluído até o momento das administrações endovenosas de MNPs.

Foram conectados, também, os eletrodos para a obtenção de registro de eletrocardiograma (ECG) (Biopac Systems modelo MEC 100C) em posição de derivação D2 (eletrodo positivo no membro inferior esquerdo, eletrodo negativo no membro superior direito e eletrodo de referência no membro inferior direito). Finalmente foi posicionado o sensor da BAC sobre a região da cavidade torácica do

animal, com o intuito de aproximar o sensor ao máximo do coração do animal, como pode ser observado pelo esquema da figura 4.

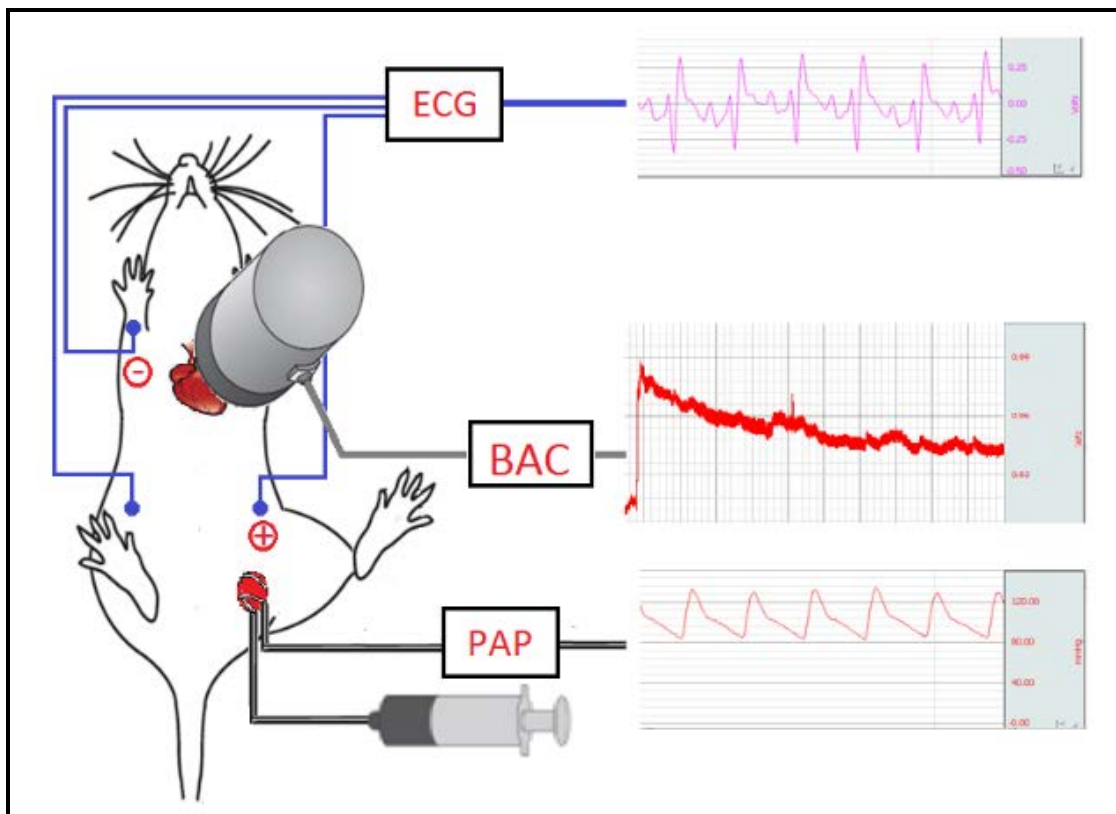


Figura 7 - Representação esquemática da metodologia empregada no experimento para aquisição da biosusceptometria de corrente alternada (BAC), eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial pulsátil (PAP).

Os animais receberam uma ou mais doses de solução contendo MNPs de ferrita de manganês, numa taxa de administração de 0,03 ml/s, conforme as características de seu grupo experimental:

- Grupo 1: seis animais que receberam três doses de 0,3ml de solução, contendo MNPs, intervaladas em 30 minutos;
- Grupo 2: seis animais que receberam uma única dose de 0,9ml de solução contendo MNPs;

Após as administrações e aquisição dos dados (BAC, ECG e PAP), os animais, ainda anestesiados, foram eutanasiados por método de decaptação (após 90 ± 10 minutos do início da primeira administração) e foram coletados 5 ml de sangue por animal e seis órgãos de interesse (coração, rim direito, rim esquerdo, pulmões, baço e fígado) para posterior análise de biodistribuição.

3.4 Biodistribuição

Foram realizados dois experimentos empregando duas técnicas diferentes (EPR e BAC) a fim de estudar a correlação entre essas duas técnicas e validar o sistema BAC como método para avaliação de biodistribuição de MNPs em animais.

Os órgãos coletados passaram pelo mesmo processo de secagem e moagem para as análises realizadas por ambas as técnicas.

Após a coleta, os órgãos permaneceram congelados a uma temperatura de -20°C , e após o período de aproximadamente uma semana foram descongelados e passaram pelo processo de secagem. Foi utilizada, para a secagem, uma estufa (Shel Lab – Mod. 1327F), onde os órgãos permaneceram por um período de aproximadamente 3 horas a uma temperatura de 50°C . Terminado o processo de secagem, os órgãos passaram, então, para o processo de moagem. Foi utilizado, para a moagem, um Almofariz de Ágata cedido pelo Departamento de Química e Bioquímica da UNESP-IBB.

Todos os órgãos moídos e secos foram devidamente identificados e armazenados em tubos *ependorf* e tubos *falcon* para posteriores análises.

3.4.1 Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica

A técnica de EPR (ou ESR – do inglês *Electron Spin Resonance*) é uma técnica de espectroscopia baseada no princípio de que sistemas de átomos ou íons na presença de um campo magnético externo variável, absorvem radiação eletromagnética, geralmente na ordem de microondas, resultando em alteração dos níveis de energia que esses sistemas de átomos ou íons se encontravam. A técnica de EPR é comumente utilizada em caracterizações magnéticas devido a sua alta seletividade, já que sistemas de átomos e íons apresentam absorção de microondas em bandas muito estreitas de campo magnético.

Para a realização deste experimento foi utilizado o espectrômetro de banda X da marca JEOL modelo JES-FA 200 (9,5GHz), do Laboratório de Ressonância Magnética Aplicada do Departamento de Física da USP – Ribeirão Preto, sob supervisão do Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho.

Os parâmetros selecionados no equipamento para a obtenção dos espectros foram: potência de microondas de 0,998 mW, campo de varredura de 186 mT a 486 mT (centrado em 336 mT), amplitude de modulação de 0,2 mT, constante de tempo de 0,03s, tempo de varredura de 2 minutos e frequência de microondas de 9450,051 MHz.

As medidas foram realizadas a uma temperatura de 18 °C e o ganho foi variável (ganho de 10 vezes para coração e rins e ganho de 5 vezes para os órgãos restantes).

As amostras homogeneizadas foram pesadas em balança analítica (Mettler Toledo modelo XP204 com resolução de 0,0001g), para a normalização da intensidade do espectro pela massa da amostra.

3.4.2 Biosusceptometria AC

Para as avaliações de biodistribuição de MNPs nos órgãos coletados via BAC, as amostras foram pesadas em balança analítica (RADWAG Wagi Elektroniczne Modelo AS220/C/2 com resolução de 0,0001g) e com o auxílio de um recipiente cilíndrico e um peso cilíndrico padronizado, a fim de controlar o volume da amostra, posicionou-se a amostra no centro de detecção do sensor e registrou-se o valor de intensidade de sinal adquirido.

3.5 Aquisição e quantificação dos dados

A aquisição dos sinais foi realizada *online* por Lock-in (Standford Research System® modelo DSP SR830) e sistema Biopac® (Amplificador Biopac Systems modelos MP150), na frequência de aquisição de 200 Hz.

O parâmetro dinâmico relacionado ao tempo de circulação das MNPs em cada animal foi quantificado por meio 1) do tempo em que a intensidade do sinal adquirido no sistema BAC levou para decair pela metade em relação ao seu pico de intensidade ($T_{1/2}$); 2) da variação de intensidade máxima do sinal (ΔI_{max}) e 3) intensidade final do sinal (I_f). Foi quantificada também a intensidade de sinal de permanência (I_p), correspondente à quantidade de material magnético que permanece na circulação, como evidencia o exemplo na figura 7. O tempo de chegada das MNPs no coração (TC) também foi avaliado, sendo calculado a partir do instante da infusão até o valor máximo de sinal da BAC adquirido.

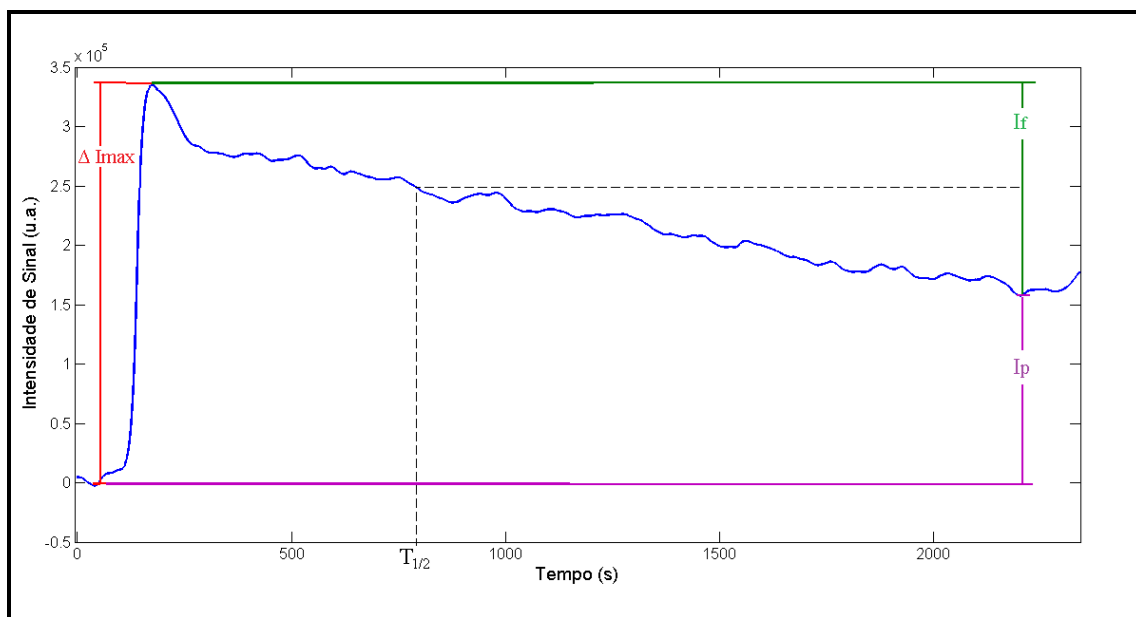


Figura 8 - Exemplo das quantificações realizadas a partir do sinal da BAC: ΔI_{max} (intensidade máxima de sinal observada), I_f (Intensidade final do sinal), I_p (intensidade de sinal de permanência) e $T_{1/2}$ (tempo de circulação).

Foi analisado o intervalo RR, ou seja, a regularidade de repetições de ondas R do ECG a fim de observar eventual presença de arritmias no perfil elétrico cardíaco após administração endovenosa de MNPs, como exemplifica a figura 9. Em adição, foi avaliada as repercussões da administração endovenosa de MNPs sobre a pressão arterial média (PAM) calculada a partir do sinal de PAP obtido.

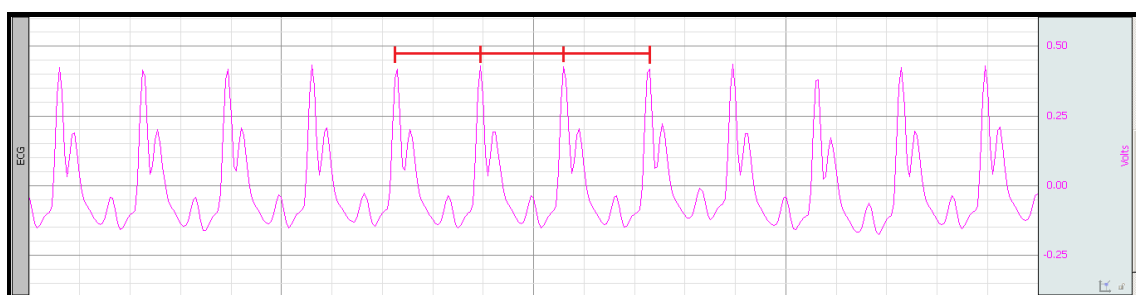


Figura 9 - Exemplo de ECG obtido na derivação D2 e do intervalo RR (demarcações em vermelho) para quantificação de arritmias.

As intensidades de sinal adquiridas pela BAC frente aos órgãos coletados são proporcionais à concentração de material marcador em cada órgão (biodistribuição).

Os dados de biodistribuição de ambas as técnicas foram quantificados de duas formas: pela intensidade absoluta do espectro adquirido via EPR e pela intensidade de sinal absoluto da BAC frente a cada amostra e também através da porcentagem de

contribuição de cada órgão na soma das intensidade de espectros (EPR) ou intensidades de sinais (BAC) de todos os órgãos de cada animal.

As intensidades dos espectros adquiridos via EPR foram analisados e quantificados em ambiente *CW-ESR-spectra*®.

Os sinais de PAP, ECG e BAC e dados obtidos foram analisados e quantificados em ambiente *MATLAB*® e *Aknowlodge 4.1.1.*®.

3.6 Forma de análise dos resultados

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises envolvendo um parâmetro em duas situações distintas no mesmo animal, foi utilizado o teste T de Student pareado. Foi utilizado o teste T de Student não pareado quando feita análise de um mesmo parâmetro em animais distintos. Quando da avaliação de um parâmetro envolvendo os mesmos animais em três situações, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA ONE WAY) para medidas repetidas e a diferença entre as condições experimentais foi verificada via pós teste de Tukey para as comparações entre todos os grupos, e pós teste de Dunnett quando comparou-se todos os grupos com um grupo em especial.

A estatística utilizada na comparação entre duas técnicas se baseou na correlação linear entre as técnicas e método de concordância de Bland Altman. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados e discussão

4.1 Passagem das nanopartículas no coração do animal

Em todos os animais que, receberam administrações seriadas de MNPs, a morfologia do sinal encontrado foi semelhante, com três picos acentuados representando a chegada de material magnético no coração e subsequentes decaimentos representando a retirada das nanopartículas do sistema circulatório.

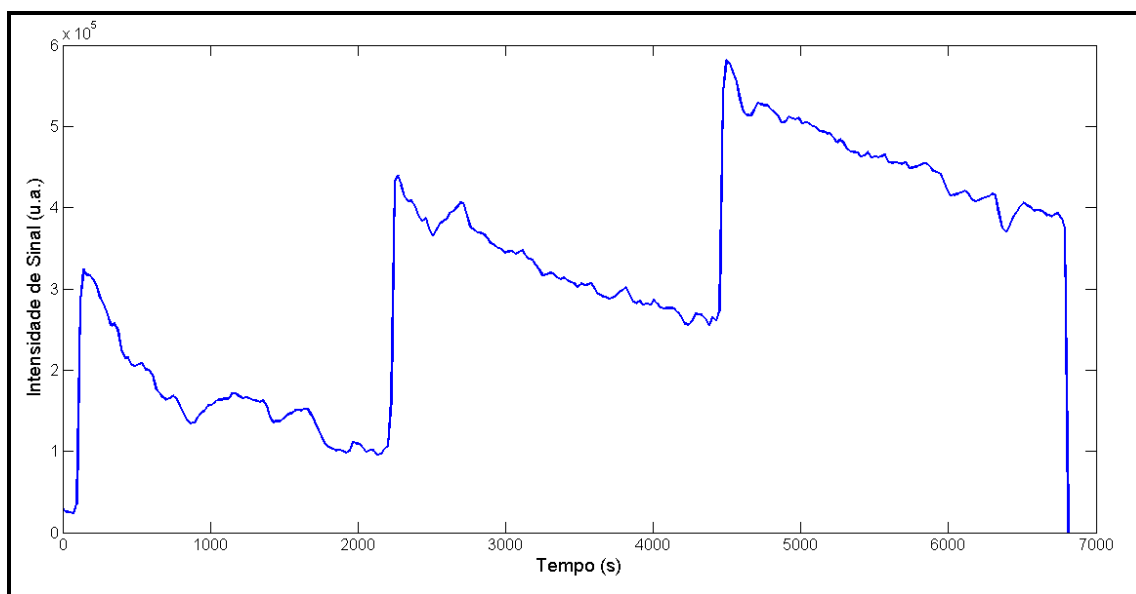


Figura 10 - Exemplo de morfologia do sinal em administrações seriadas de MNPs.

A figura 10 é representativa de um sinal adquirido com três administrações consecutivas de MNPs, ilustrando o decaimento do sinal possivelmente relacionado com a retenção e/ou captação das MNPs em diferentes órgãos. Pode-se observar, também, no exemplo da figura 10, que o segundo pico, que representa a segunda administração de MNPs, apresenta uma taxa de queda de sinal menor do que o observado na primeira administração, o que sugere alteração na velocidade de retirada das MNPs da circulação sanguínea com consequente influencia sobre os valores de $T_{1/2}$ obtidos. Pode-se verificar ainda, que os valores de I_p tendem a crescer, o que mostra a remanescência de MNPs no compartimento vascular do animal.

A figura 11 apresenta um traçado representativo do sinal adquirido de um animal que recebeu apenas uma dose de MNPs:

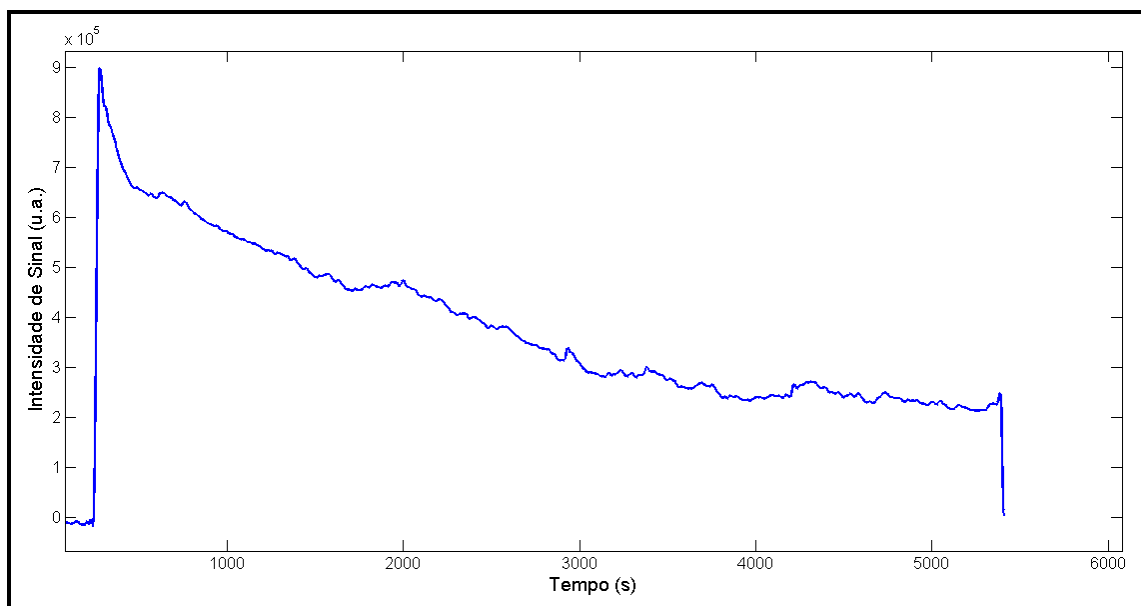


Figura 11 - Exemplo de morfologia de sinal encontrada em uma administração de 0,9ml de solução contendo as MNPs.

A figura 11, assim como a figura 10, apresenta um perfil onde se pode observar um pico de chegada das MNPs no coração do animal e um posterior decaimento, ilustrando a captação e retenção das MNPs pelos órgãos em questão.

A figura 12 apresenta os valores de ΔI_{max} , adquiridos em administrações seriadas de MNPs no grupo 1, e mostra que as médias não diferiram estatisticamente, confirmando que o sensor do sistema BAC é sensibilizado da mesma forma por quantidades iguais de MNPs em trânsito no sistema circulatório do animal, e que a adição de material magnético (segundas e terceiras administrações) sensibiliza o sensor de forma proporcional à quantidade de material magnético adicionado no sistema circulatório do animal.

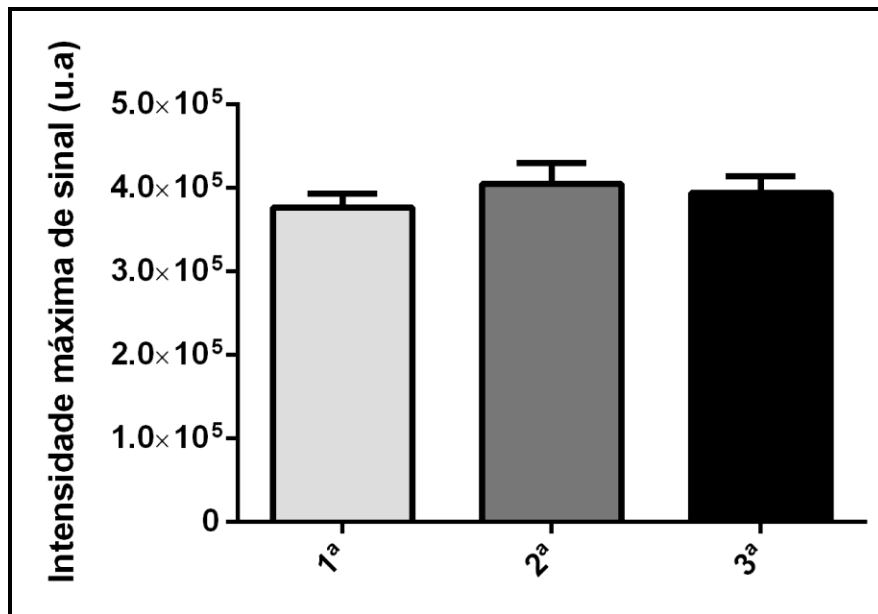


Figura 12 - Intensidade máxima de sinal ($\Delta I_{\max}$) detectada pelo sistema BAC em cada administração de MNPs no grupo 1.

Foi feita uma correlação de $\Delta I_{\max}$, figura 13, onde foram somados os $\Delta I_{\max}$ das três administrações no grupo 1, e essa soma foi comparada à intensidade máxima de sinal encontrada na administração no grupo 2.

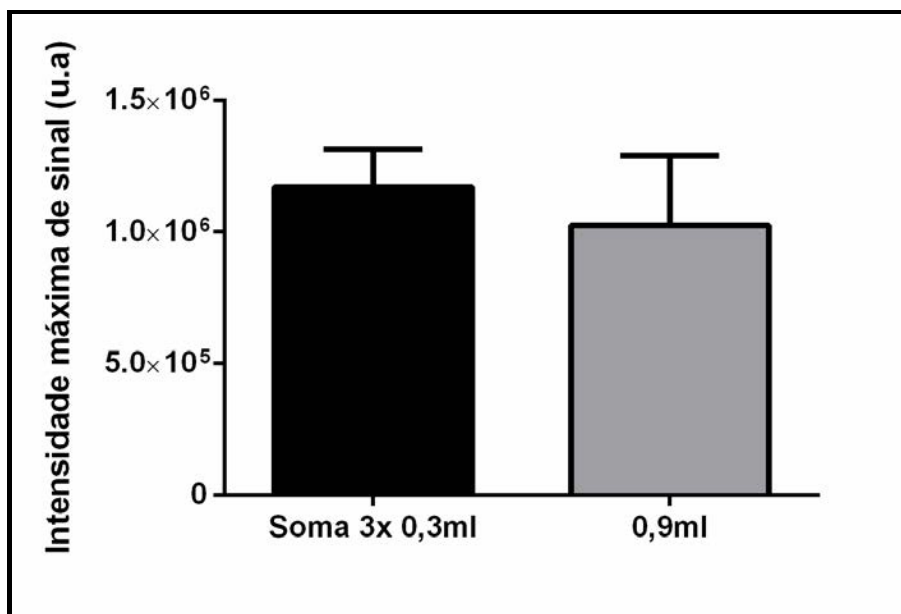


Figura 13 - Comparação da média da soma dos $\Delta I_{\max}$ encontrados nas três administrações no grupo 1 aos valores de intensidade máxima encontrados em uma administração no grupo 1.

Como se pode observar na figura 13, a soma dos $\Delta I_{\max}$ das três administrações de 0,3ml no grupo 1, não se mostraram estatisticamente diferentes dos valores de intensidade máxima encontrados em uma administração no grupo 2. Esses dados corroboram a hipótese de que o sensor BAC é sensibilizado da mesma forma por quantidades iguais de material magnético, indicando a excelente reprodutibilidade da técnica.

A partir das quantificações de I_f , foi realizada uma comparação entre a soma das intensidades finais do sinal dos animais do grupo 1 e os valores de intensidade de sinal encontrados no animais do grupo 2 com uma única administração, como mostra a figura 14.

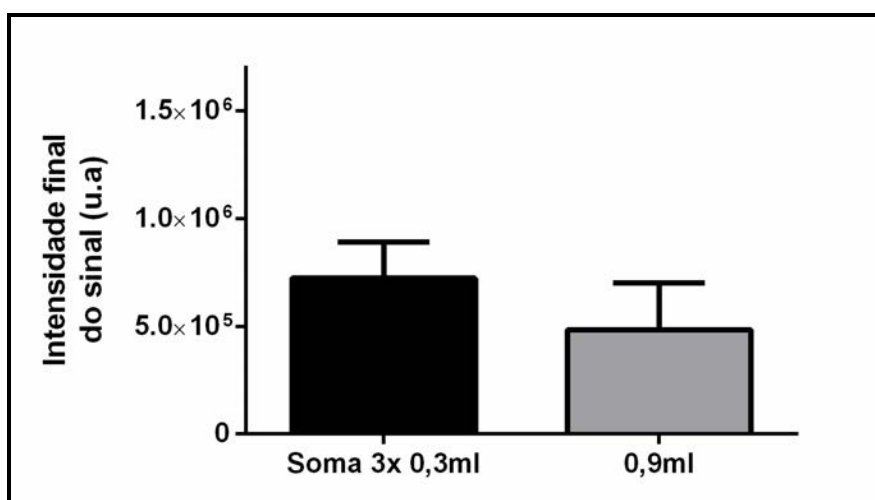


Figura 14 - Comparação da média da soma de intensidades finais de sinal encontrados nas três administrações no grupo 1 à média de intensidade final de sinal encontrados em uma administração no grupo 2.

A soma dos valores de intensidade final de sinal dos animais do grupo 1 e a intensidade final de sinal encontrada nos animais do grupo 2, não mostraram diferenças significativas ($p=0,06$). Essa equidade entre os valores encontrados nos dois grupos pode se dar pelo fato de os órgãos responsáveis pela retirada das MNPs da corrente sanguínea, através de processos de aprisionamento ou filtração, apresentarem taxas constantes de retirada das MNPs do sangue, visto que os animais dos dois grupos foram eutanasiados aproximadamente 90 minutos após as primeiras administrações de MNPs por via endovenosa.

A figura 15 apresenta os valores da soma de I_p , referentes à intensidade de sinal relacionada à permanência de MNPs na corrente sanguínea, de cada administração dos animais do grupo 1, e os valores de I_p dos animais do grupo 2.

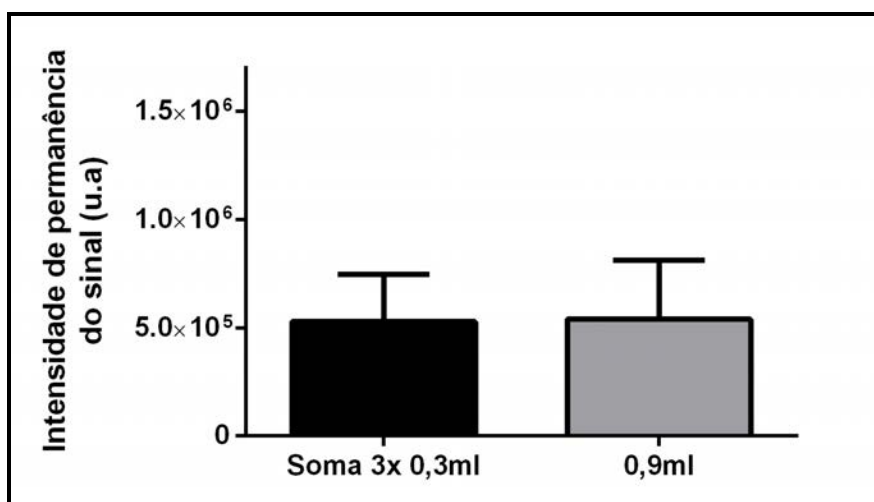


Figura 15 - Comparação da média da soma das intensidades de sinal de permanência encontrados nas três administrações no grupo 1 à média de intensidade de sinal de permanência encontrados em uma administração no grupo 2.

Os valores de I_p são diretamente dependentes dos valores de I_f , pois quanto menor a retirada de MNPs do sangue, maior o sinal referente à permanência de MNPs na circulação, o que explica a paridade entre os valores encontrados de I_p nos dois grupos, já que essa paridade também foi encontrada nos valores de I_f .

Os valores de $T_{1/2}$, relacionados à dinâmica da passagem das MNPs nos corações dos animais, do grupo 1, estão expostos na figura 16.

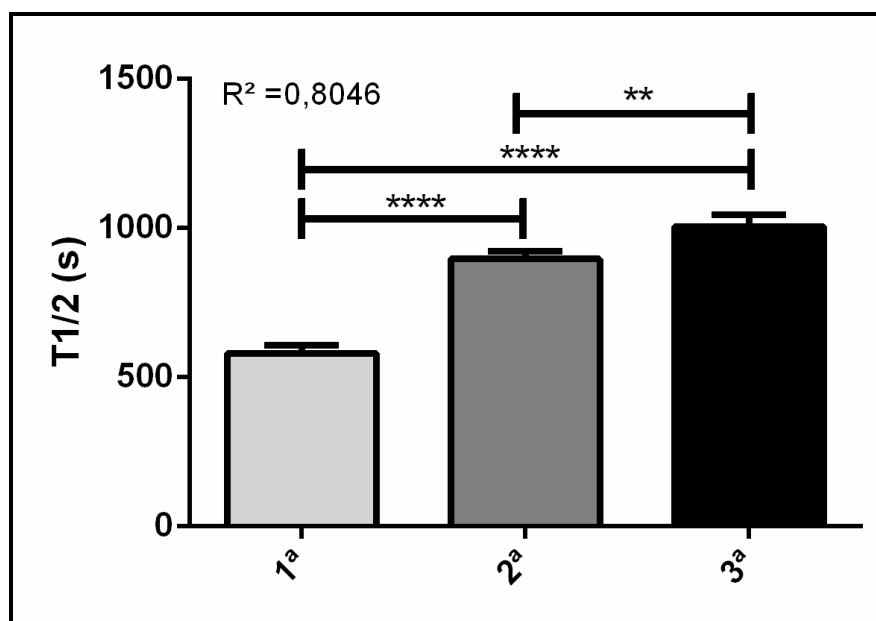


Figura 16 - Médias de $T_{1/2}$ encontradas em cada administração no grupo 1. (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$.

Como pode-se observar na figura 16, os valores de $T_{1/2}$ encontrados em cada administração se mostraram significativamente diferentes, segundo os testes estatísticos aplicados. Foi constatada, também, uma tendência linear significativa ($R^2 = 0,8046$, $p < 0,0001$), evidenciando que conforme se administra quantidades adicionais de MNPs na circulação sanguínea, o $T_{1/2}$ aumenta. Esses dados sugerem que os órgãos responsáveis pela retirada desse material da corrente sanguínea podem se saturar, diminuindo, assim, sua velocidade de captação e / ou retenção, o que influenciou diretamente os valores de $T_{1/2}$ obtidos.

Encontrou-se, então, um $T_{1/2}$ médio de 580 ± 66 s para a primeira administração, um $T_{1/2}$ médio de 897 ± 62 s para a segunda administração e um $T_{1/2}$ médio de 1004 ± 96 s para a terceira administração, sendo que os intervalos de 30 minutos entre as doses foi pré-estabelecido e não corresponde com a depuração total das MNPs do sangue, como será mostrado no item 4.2. Com este experimento espera-se apenas comprovar a eficácia do sistema BAC para possíveis aferições de $T_{1/2}$, até a depuração total, de MNPs na corrente sanguínea. Sendo assim, o sistema obteve bom desempenho e, com pequenas adaptações no protocolo experimental (no sentido de aumentar o tempo de aquisição), pode-se realizar aferições de $T_{1/2}$ com eficácia, exatidão e reprodutibilidade.

O tempo de meia vida é um fator de extrema importância quando há a utilização de MNPs como material traçador ou como contraste. Existem trabalhos na literatura que

apontam diversos valores de $T_{1/2}$, desde poucos minutos até varias horas, dependendo de seu revestimento e sua aplicação (SUN et al., 2008). Esse parâmetro depende fortemente de vários outros fatores, como o revestimento, dispersão dimensional, carga de superfície e potencial Zeta, tornando o valor de $T_{1/2}$ uma característica intrínseca do tipo de MNP utilizada. O $T_{1/2}$ também é influenciado pela biodistribuição das MNPs, pois seu valor é inversamente proporcional à velocidade de captação e/ou retenção das MNPs pelos órgãos envolvidos. Salienta-se ainda que este parâmetro possui diferentes definições (maneira de cálculo) para cada tipo de técnica, e neste trabalho foi utilizado um método específico, descrito no item 3.5, para a avaliação do sinal do sistema Biosusceptometria AC.

A soma dos valores de $T_{1/2}$ encontradas em cada uma das administrações, do grupo 1, foram comparadas à média de $T_{1/2}$ encontrada nos animais do grupo 2, como mostra a figura 17.

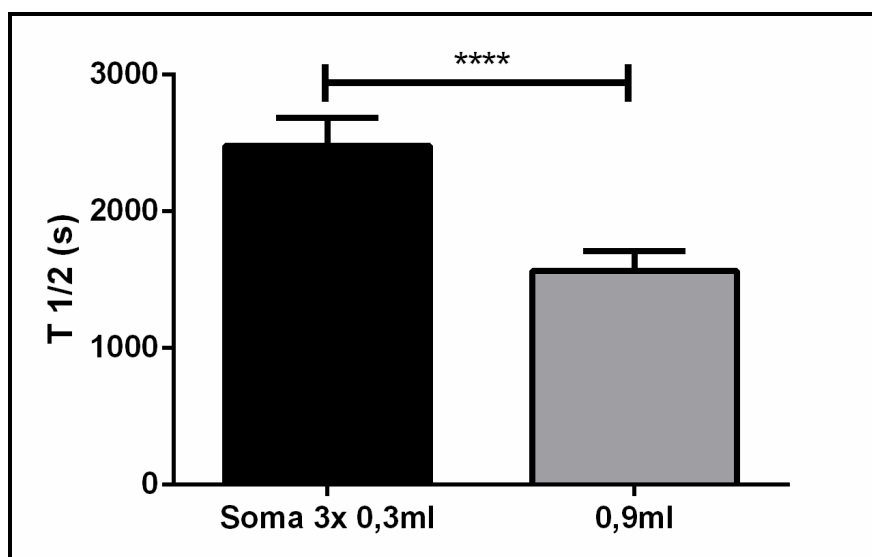


Figura 17 - Comparação da média da soma dos $T_{1/2}$ encontrados nas três administrações no grupo 1 à média dos $T_{1/2}$ encontrados em uma administração no grupo 2. (****) $p < 0,0001$.

As médias da soma de $T_{1/2}$ dos animais que receberam três administrações, grupo 1, se mostraram estatisticamente diferentes da média de $T_{1/2}$ dos animais do grupo 2. Esse fato pode ter ocorrido por uma possível sobrecarga de dose, que pode ter desencadeado, nos órgãos envolvidos com a retenção e captação das MNPs, mecanismos de ação intrínsecos para aumentar a retirada das MNPs da circulação nos primeiros momentos após a administração, até que a quantidade de MNPs no sangue

chegasse a níveis aceitáveis. E após esse mecanismo ser desativado, os órgãos poderiam estar saturados e com uma menor taxa de retenção do que em níveis de doses normais, visto que segundo os gráficos expostos na figura 14 e 15, as quantidades de material magnético que continuaram na circulação sanguínea não diferiram estatisticamente entre os grupos. Porém mediar e estudar os mecanismos de ação aqui especulados, não fazem parte dos objetivos deste trabalho, deixando, assim, uma possibilidade para futuros projetos baseados em investigações fisiológicas mais profundas destes mecanismos de ação.

As médias de TC, relacionadas com a chegada das MNPs no coração do animal, encontradas para cada uma das três administrações, nos animais grupo 1, estão apresentadas na figura 18.

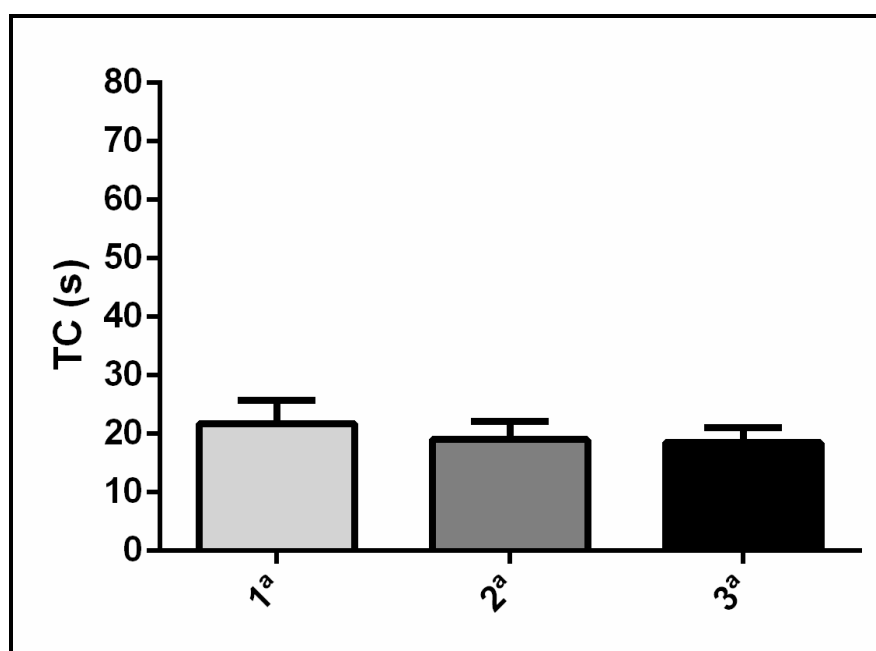


Figura 18 - Médias de TC encontradas em cada administração no grupo de animais do grupo 1.

O TC apresentou uma média de 21 ± 9 s na primeira administração, 19 ± 7 s na segunda administração e 19 ± 6 s na terceira administração. Esses dados são de grande importância, já que, devido à falta de instrumentação com alta resolução temporal na área, não existem estudos que medem o tempo que as MNPs levam para percorrer uma distância dentro do sistema circulatório de maneira pouco invasiva e com aquisição *online*. A partir destas observações, e sabendo-se a área da secção transversal dos vasos por onde as MNPs passam para chegar ao coração, pode-se calcular, ainda, o fluxo sanguíneo nos vasos que constituem o trajeto das MNPs.

Ainda que neste trabalho as administrações foram feitas manualmente, com auxílio de uma seringa, além de utilizar um modelo animal dimensionalmente limitado (ratos), estes dados mostram a capacidade do sistema BAC realizar aferições destes tipos ($T_{1/2}$ e TC), inserindo uma nova ferramenta para o estudo da dinâmica de diferentes MNPs dentro de organismos e sistemas biológicos. E a fim de futuramente estudar esses parâmetros de um ponto de vista puramente fisiológico ou de caracterização pré-clínica de diferentes MNPs, pode-se assegurar a não interferência do fator humano utilizando uma bomba de infusão para a administração do traçador.

Extrapolando as capacidades da técnica, e visando futuras aplicações em modelos experimentais maiores e aplicações clínicas em humanos, essa dependência dimensional deixa de existir, possibilitando, ainda, o emprego de maior número de sensores sobre o coração, o que possibilita a associação de valores de intensidades de sinal com tons de pixel para formar imagens da passagem de MNPs pelas cavidades cardíacas.

4.2 Biodistribuição

Os valores médios encontrados a partir dos sinais absolutos da BAC e do EPR, normalizados pela massa da amostra seca, referentes à biodistribuição para cada órgão coletado, dos animais do grupo 1, e referentes aos animais do grupo 2, estão apresentados na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Valores médios de sinal, ponderados pela massa, encontrados no grupo de animais que recebeu três doses de 0,3ml de MNPs.

Órgão	BAC (mV)	EPR (u.a.)
Coração	$0,681 \pm 0,094$	$8440,137 \pm 462,455$
Pulmões	$2,835 \pm 0,693$	$26166,968 \pm 2507,673$
Fígado	$13,297 \pm 1,770$	$118737,772 \pm 6271,362$
Rim Direito	$0,361 \pm 0,075$	$4940,728 \pm 731,112$
Rim Esquerdo	$0,349 \pm 0,098$	$3546,477 \pm 244,480$
Sangue	$4,551 \pm 1,076$	$39508,410 \pm 3966,468$
Baço	$12,924 \pm 2,096$	$116452,718 \pm 18347,227$

Tabela 3 - Valores médios de sinal, ponderados pela massa, encontrados no grupo de animais que recebeu uma dose de 0,9ml de MNPs.

Órgão	BAC (mV)	EPR (u.a.)
Coração	$0,870 \pm 0,165$	$9566,887 \pm 1873,767$
Pulmões	$4,096 \pm 1,357$	$62529,677 \pm 17525,419$
Fígado	$13,400 \pm 2,325$	$107465,105 \pm 8840,392$
Rim Direito	$0,549 \pm 0,129$	$6208,856 \pm 1245,667$
Rim Esquerdo	$0,550 \pm 0,129$	$4903,556 \pm 1106,516$
Sangue	$8,405 \pm 0,832$	$63236,325 \pm 14779,464$
Baço	$17,678 \pm 4,300$	$136400,067 \pm 14133,222$

A partir dos valores utilizados para calcular as médias apresentadas nas Tabelas 2 e 3, foi feita uma normalização a fim de estudar a contribuição percentual de cada órgão na soma dos sinais de todos os órgãos. As médias dos sinais normalizados adquiridos via BAC e EPR, do grupo 1, estão apresentado na figura 19.

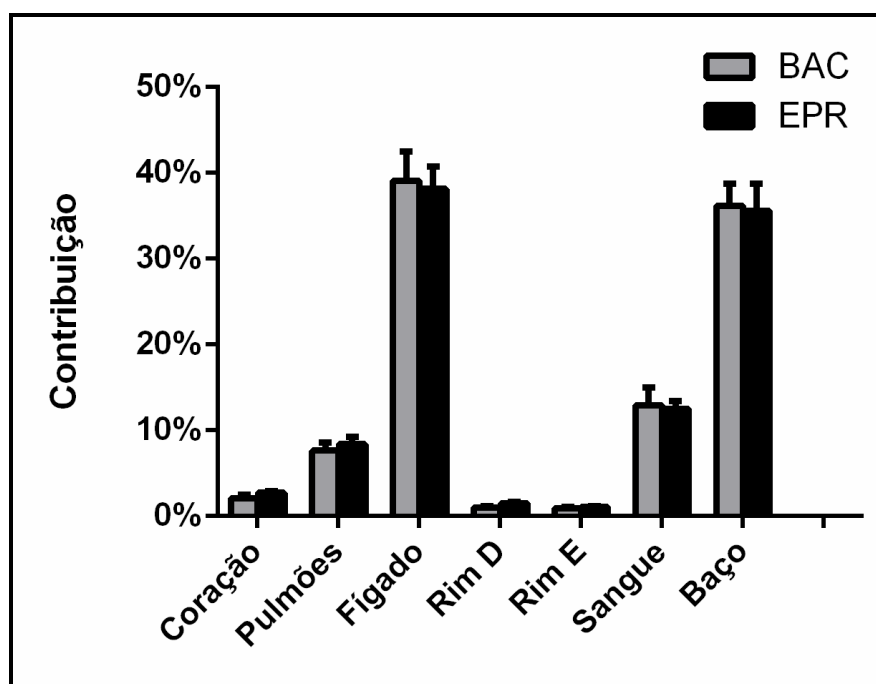


Figura 19 - Contribuição percentual de cada órgão na soma dos sinais de todos os órgãos dos animais do grupo 1.

A figura 20 apresenta as médias dos sinais normalizados de ambas as técnicas (BAC e EPR), do grupo de animais do grupo 2.

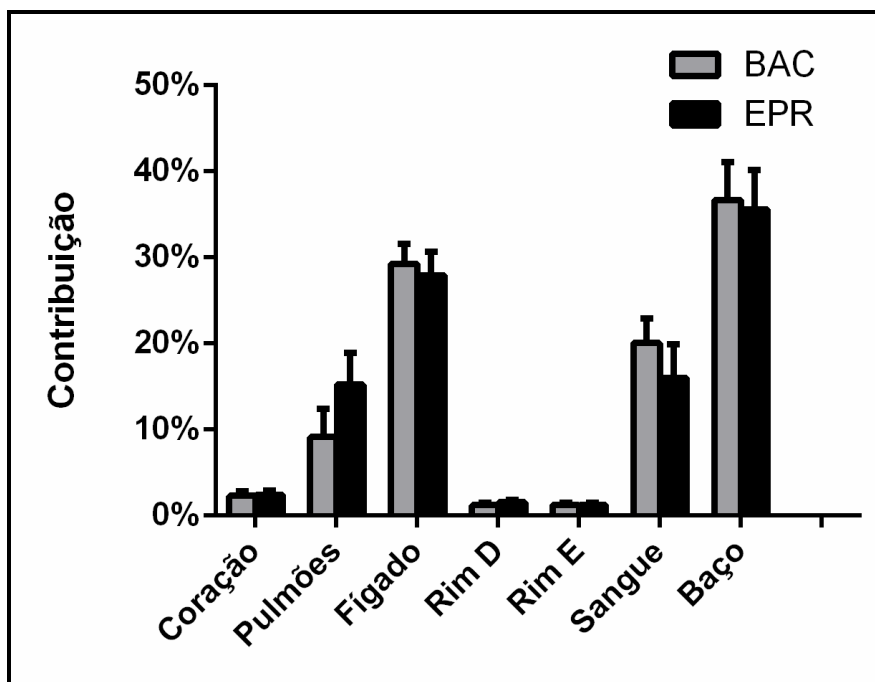


Figura 20 - Contribuição percentual de cada órgão na soma dos sinais de todos os órgãos dos animais do grupo 2.

A biodistribuição predominante se deu para o fígado, porém foram encontrados acúmulos significativos nos pulmões e baço, como pode ser observado na figura 19 e 20. A normalização percentual realizada mostrou a proporcionalidade na distribuição do volume total de MNPs medido no organismo do animal. A figura 19 segue o mesmo perfil de distribuição que a figura 20 apresenta. Os testes estatísticos aplicados não encontraram diferenças significativas entre as técnicas, o que evidencia o excelente desempenho do sistema BAC em analisar as quantidades de MNPs captadas em cada órgão e as proporções de distribuição deste material dentro de um organismo biológico.

A fim de comprovar a eficácia da técnica foram realizadas análises de correlação linear e análise de concordância de Bland Altman. A análise de correlação linear para o grupo 1, utilizando as amostras de todos os órgãos de todos os animais ($n=42$), estão expostas na figuras 21.

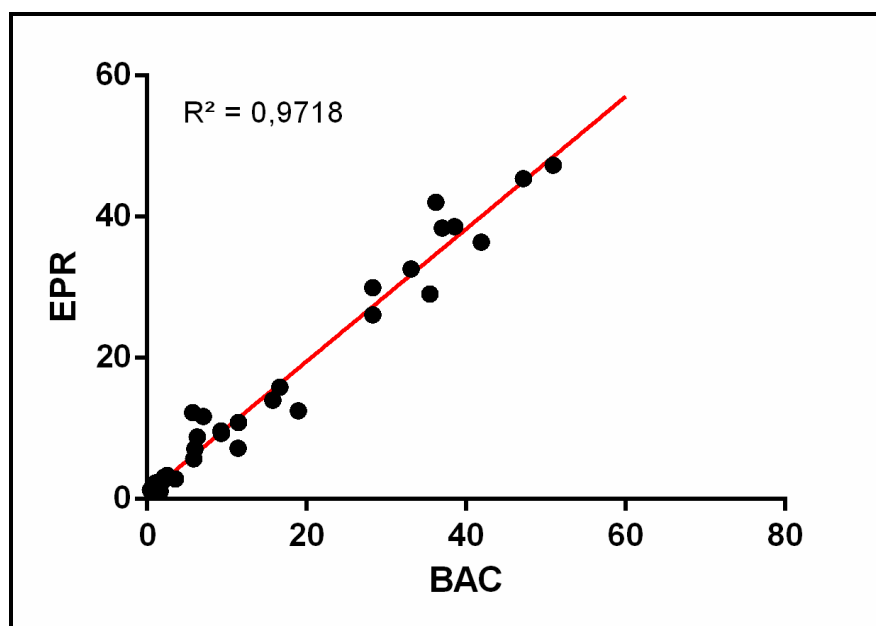


Figura 21 - Correlação linear entre as técnicas BAC e EPR, utilizando as amostras de todos os órgãos do grupo 1.

A figura 22 apresenta a análise de correlação linear das amostras dos órgãos de todos os animais pertencentes ao grupo 2.

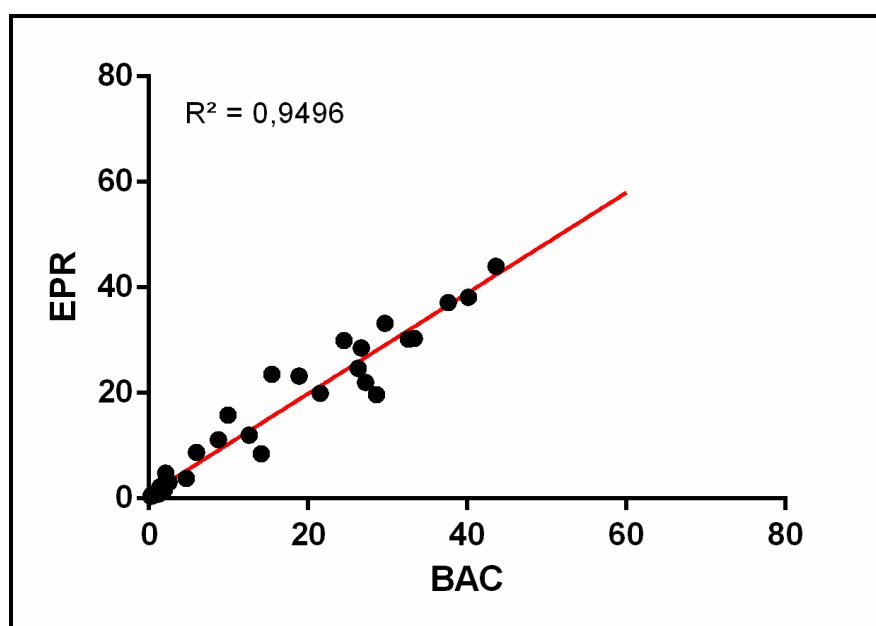


Figura 22 - Correlação linear entre as técnicas BAC e EPR, utilizando as amostras de todos os órgãos do grupo 2.

A implementação do método de concordância de Bland Altman, que analisa a diferença entre as técnicas para cada amostra e a média das diferenças, também foi

realizada utilizando as amostras de todos órgãos de cada animal de ambos os grupos. A figura 23 evidencia a concordância entre as técnicas para o grupo 1.

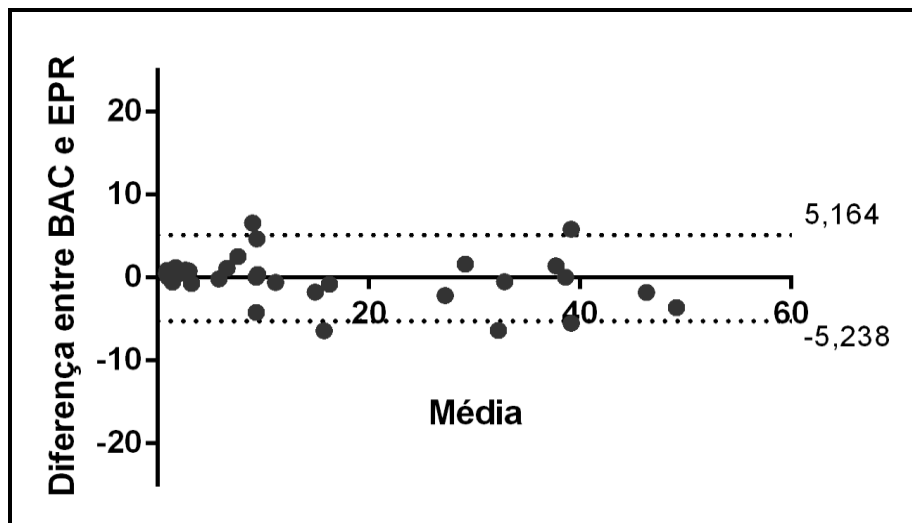


Figura 23 - Método de concordância de Bland Altman entre as técnica BAC e EPR para o grupo 1.

A figura 24 mostra, mais uma vez, a concordância entre as técnicas BAC e EPR, através do método de concordância de Bland Altman para o grupo 2.

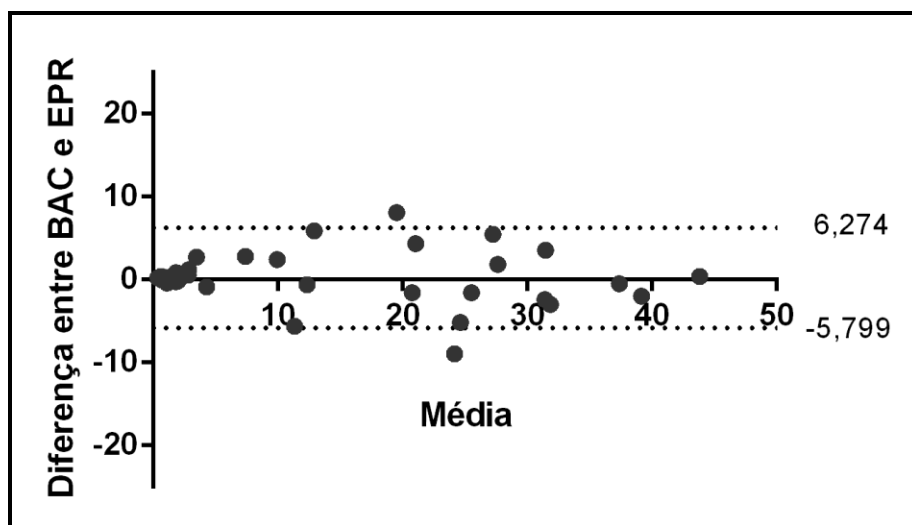


Figura 24 - Método de concordância de Bland Altman entre as técnica BAC e EPR para o grupo 2.

Pode-se observar desde a figura 19 até a figura 24, onde foram apresentados gráficos de coluna, correlação linear e método de concordância de Bland Altman, para dois grupos diferentes, que a técnica BAC obteve excelentes resultados na aferição dos destinos finais das MNPs no organismo do animal. A técnica BAC foi, então,

confrontada com uma técnica complexa, extremamente precisa e considerada padrão ouro, o EPR, e obteve excelentes resultados de concordância em ambas as análises. Esses dados provam a eficácia da BAC e disponibilizam uma nova ferramenta em estudos de caracterização pré-clínica de MNPs, onde o alvo desses estudos é mapear o destino final das MNPs no organismo do animal (biodistribuição). Além de se mostrar eficaz, a técnica BAC mostra outras vantagens sobre a técnica de EPR em estudos de biodistribuição, como seu baixo custo e portabilidade.

A fim de estudar a diferença de biodistribuição das MNPs entre os dois grupos de animais estudados, foi feita uma comparação entre as médias de porcentagens de contribuição de cada órgão para ambos os grupos, apresentada na figura 25.

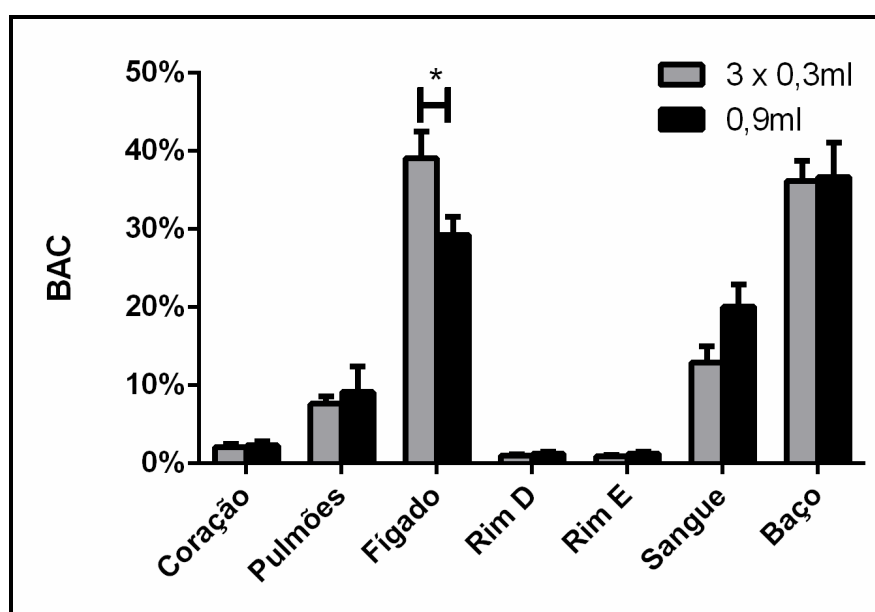


Figura 25 - Comparação de biodistribuição entre os dois grupos estudados. (*) $p < 0,05$.

As figuras 19, 20 e 25 mostram que as maiores retenções de MNPs se deram no fígado e baço seguido de pulmões e sangue. A comparação entre os dois grupos estudados apresentou diferença estatística entre as contribuições de sinal do fígado. Essa diferença pode ter ocorrido pela possível sobrecarga de dose administrada no grupo que recebeu 0,9ml de MNPs (grupo 2), o que pode ter desencadeado os mecanismos sugeridos anteriormente no item 4.2, e aumentado a taxa de captura de outros órgãos como pulmões e baço, porém como essa quantidade, responsável pela diferença, pode ter sido dividida em mais de um órgão, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre eles. Sugerimos que a captura do composto pelo fígado esteja relacionada ao perfil de capilares descontínuos característicos deste órgão. Em adição,

não podemos descartar a ação fagocitária das células de Kupffer presentes nesse tecido e constituintes do sistema retículo endotelial. O baço também apresentou retenção de MNPs que pode ser resultante do escape deste composto pelos capilares descontínuos assim como pode ser resultante da ação fagocitária de células do sistema retículo endotelial presentes neste órgão. Já no pulmão, o acúmulo encontrado pode ser explicado pelo tamanho reduzido dos capilares pulmonares, onde pode existir dificuldade da passagem de parte das MNPs, o que acarreta em acúmulo de MNPs neste órgão. O sangue apresentou também significativa quantidade de MNPs, pois no tempo em que foram definidas as padronizações de administrações realizadas neste experimento, não houve completa retirada de MNPs do sangue, deixando, este trabalho, mais uma sugestão de possibilidade de projetos futuros, onde possa ser investigada com precisão a depuração total das MNPs do sangue. Outro fato que não pode ser desconsiderado é que os órgãos que apresentaram maiores acúmulos têm como uma de suas principais características a alta vascularização.

Os dados de biodistribuição obtidos foram semelhantes a dados encontrados na literatura, em experimentos que utilizam tipos diferentes de MNPs das que foram utilizadas neste trabalho, por exemplo nanopartículas de óxido de ferro mono-disperso revestidas com sílica (WUNDERBALDINGER et al., 2002b) ou revestidas com dextran (KONG et al., 2012). Apesar das nanopartículas apresentarem características que variam conforme se altera o material do núcleo, o revestimento e a solução em que estão dispersas, sempre foram documentados grandes acúmulos no fígado, pulmão e baço.

4.3 Análises Cardiovasculares

Na primeira administração de MNPs via endovenosa, encontrou-se uma hipotensão transitória com uma queda de aproximadamente 47% da PAM em níveis pré-administração, no grupo 1, e uma queda de aproximadamente 49% da PAM, no grupo 2, como mostram as figuras 26 e 27, respectivamente.

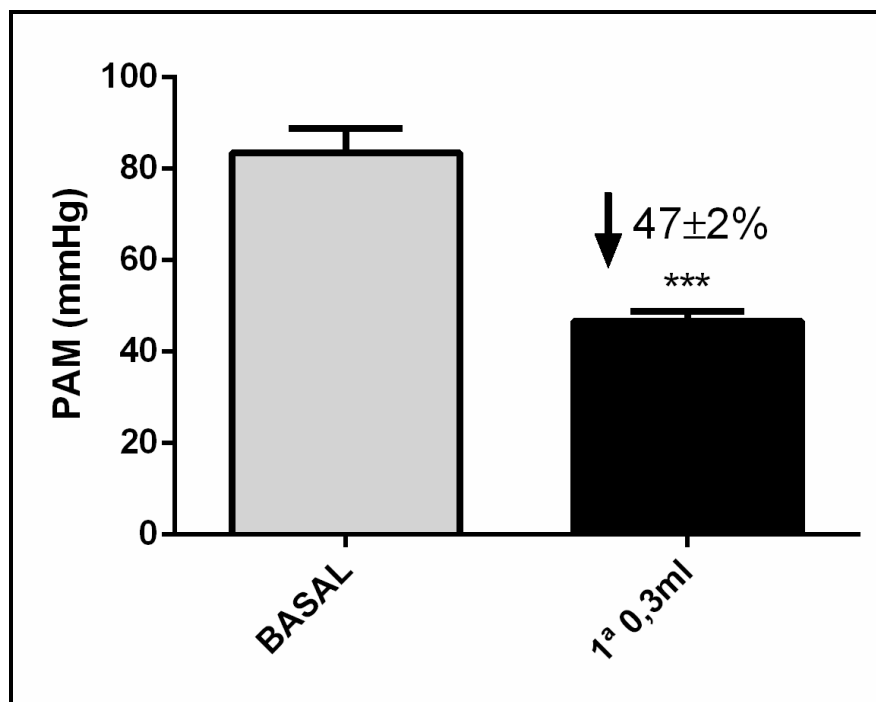


Figura 26 - Média da PAM sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs no grupo 1. (***) $p < 0,001$.

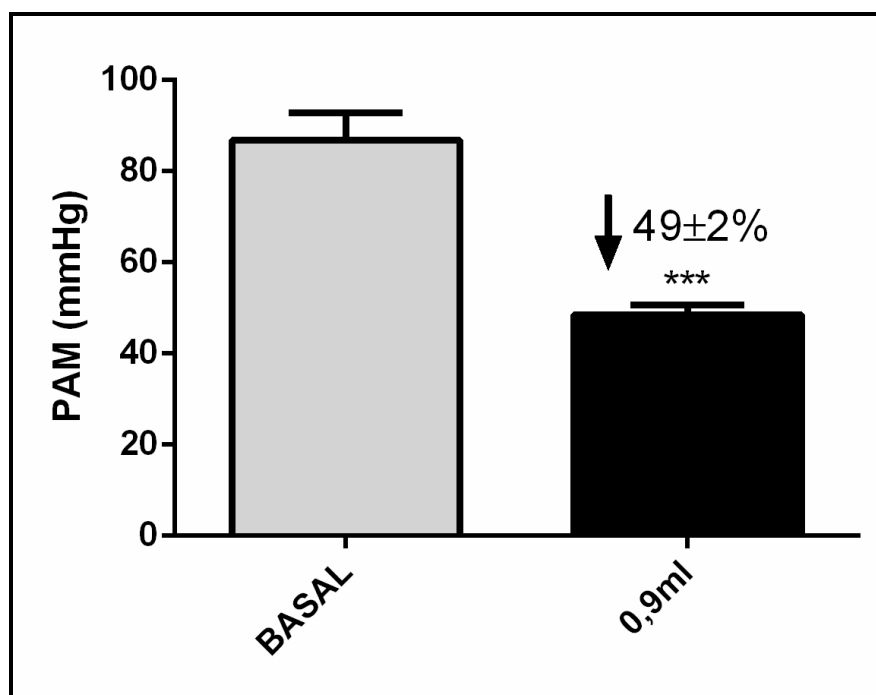


Figura 27 - Média da PAM sem MNPs (basal) e após a administração de MNPs no grupo 2. (***) $p<0,001$.

A comparação entre a queda da PAM na primeira administração de MNPs nos animais do grupo 1 com queda encontrada na a administração do grupo 2, está apresentada na figura 28.

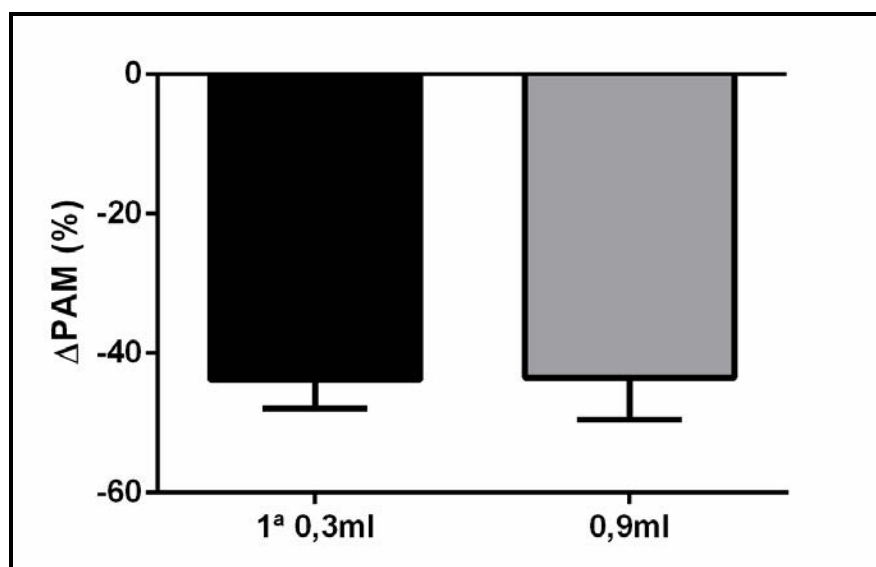


Figura 28 – Porcentagem média de queda da PAM na primeira administração de MNPs nos animais do grupo um em comparação com a porcentagem de queda encontrada na administração de MNPs nos animais do grupo 2.

A primeira administração de MNPs apresentou uma hipotensão nos dois grupos de animais. Os testes estatísticos não revelaram diferença significativa entre a primeira administração de 0,3ml de MNPs no grupo 1 e a administração de 0,9ml de MNPs no grupo 2. Esses dados mostram que a queda da PAM não aumenta com o aumento da dose de MNPs.

A figura 29 apresenta a média das porcentagens da variação da PAM em administrações consecutivas.

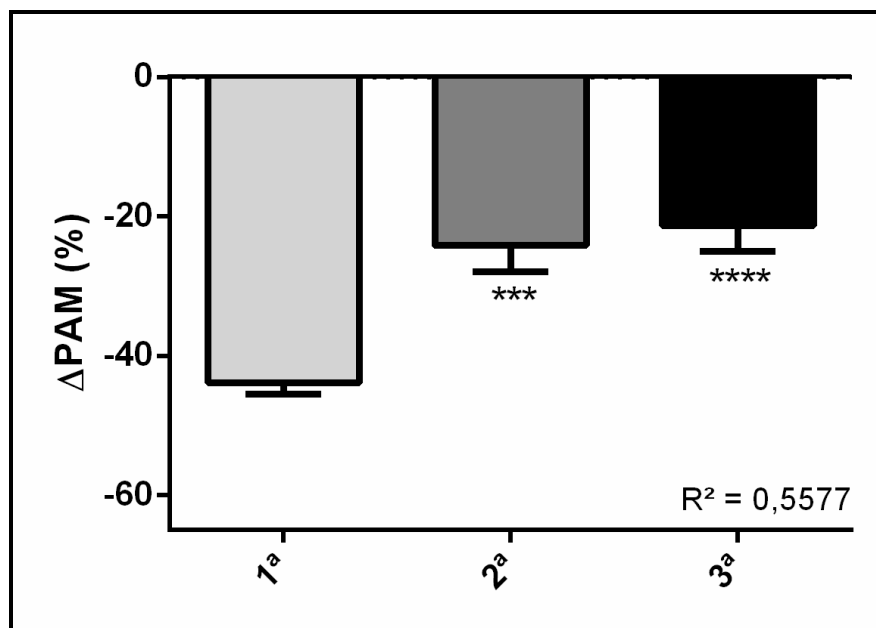


Figura 29 – Porcentagem médias de queda da PAM em cada uma das administrações de MNPs no grupo 1.

O teste estatístico aplicado encontrou diferenças significativas entre as diferentes administrações, o que significa que as administrações adicionais promovem menor queda na PAM do que a primeira administração. O teste estatístico apresentou uma tendência linear, ou seja, a cada administração a PAM tende a cair menos, o que torna relativamente simples o possível controle de hipotensão em estudos futuros utilizando a associação de drogas vasoconstritoras como a fenilefrina. Além disso, a menor queda da PAM em administrações adicionais permitem reajustes da dose de MNPs, quando necessária, em casos terapêuticos, como entrega guiada de fármacos ou hipertermia magnética. Essa hipotensão transitória pode se dar por estresse de cisalhamento das MNPs na parede dos vasos, o que acarreta em liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos culminando em vasodilatação e consequente

hipotensão, e pode se dar, também, por outros mecanismos cardíacos e/ou vasculares que influenciam os valores de PA.

Os tempos de manifestação do pico de hipotensão encontrados estão apresentados na figura 30.

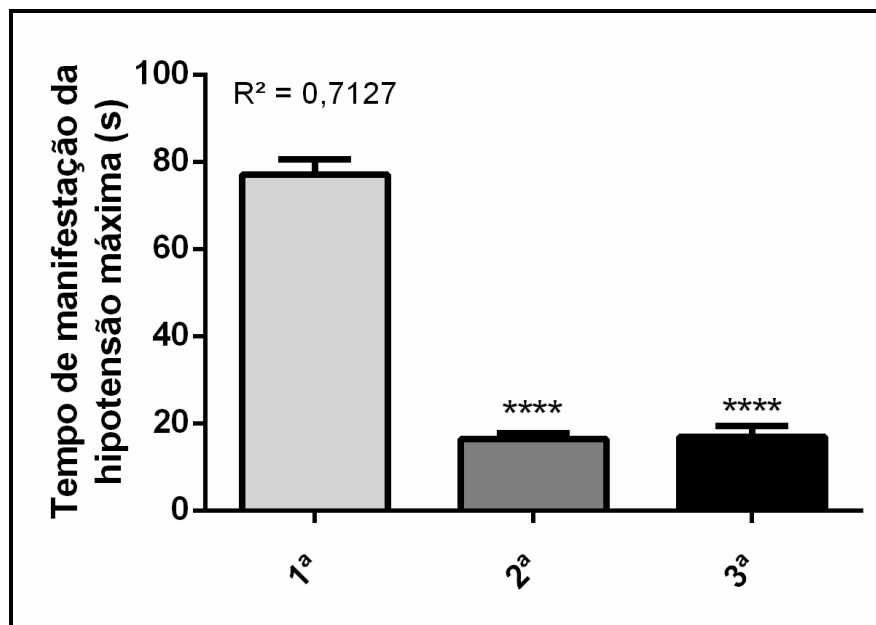


Figura 30 - Médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima observada em cada uma das administrações no grupo 1.(****) $p < 0,0001$.

Existiram diferenças significativas nos tempos de manifestação de hipotensão entre a primeira e as demais administrações, porém os tempos de manifestação encontrados nas segundas e terceiras administrações não diferem estatisticamente entre si. A ocorrência dessa diferença estatística encontrada pode ser explicada pela biodisponibilidade de óxido nítrico, ou outros agentes de regulação pressórica, no organismo do animal, ou seja, nas primeira administração as células endoteliais dos vasos apresentavam grande biodisponibilidade de agentes de regulação pressórica e consequentemente a liberação destes agentes foi maior do que nas últimas administrações, onde a reserva pode ter diminuído consideravelmente. Essa questão abre, ainda, um nicho de possíveis estudos visando o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos com a hipotensão transitória após administração endovenosa de MNPs, os quais não foram alvo deste trabalho.

A figura 31 apresenta a comparação entre as médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima entre a primeira administração do grupo 1 e a administração no grupo 2.

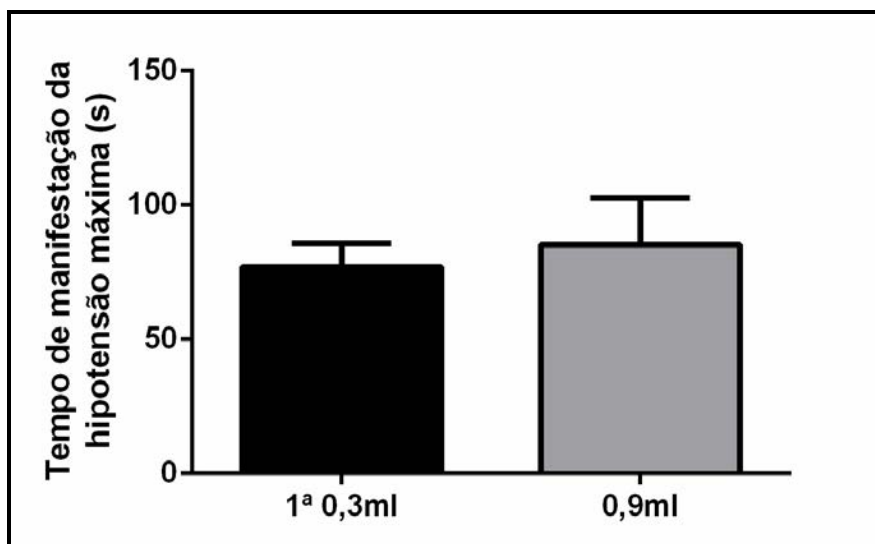


Figura 31 - Médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima observada em cada grupo.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos de manifestação de hipotensão máxima entre a primeira administração no grupo 1 e a administração no grupo 2.

Os tempos de recuperação da PAM, nas três administrações realizadas no grupo 1, estão apresentados na figura 32.

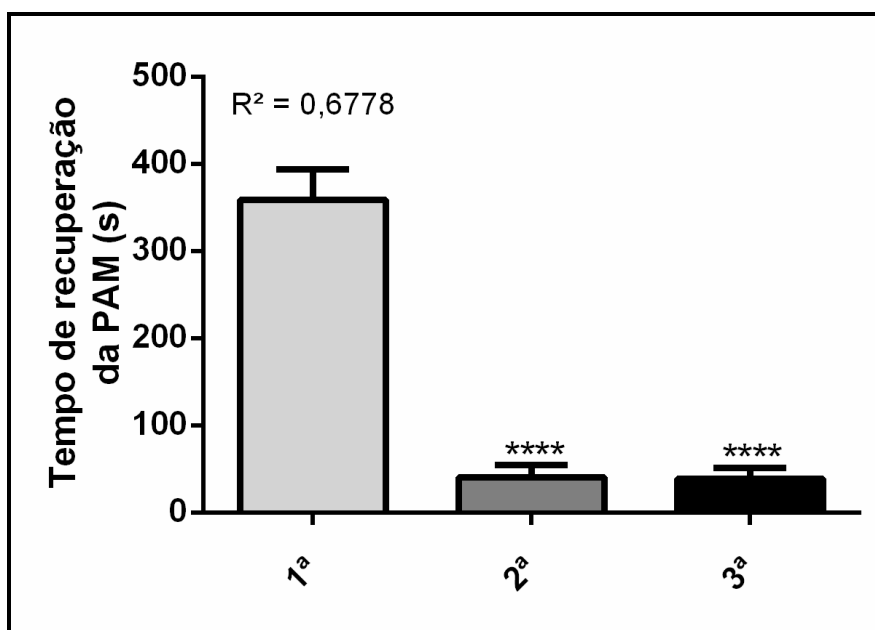


Figura 32 - Médias dos tempos de retorno da PAM aos níveis pré-administração em cada uma das administrações no grupo 1.(****)p<0,0001.

O tempo de recuperação da PAM à níveis pré-administração foi de aproximadamente $5,9 \pm 0,6$ minutos na primeira administração, $0,56 \pm 0,13$ minutos na segunda administração e $0,64 \pm 0,2$ minutos na terceira administração, o que evidencia o perfil transitório de hipotensão encontrado. Desta forma, apesar da administração endovenosa de MNPs, nas doses utilizadas neste trabalho, apresentar uma queda significativa da PAM, essa hipotensão se apresenta com perfil transitório e de fácil recuperação. Em adição pode ser reportada também a ausência total de óbitos dos animais empregados neste estudo, corroborando o fato de que a hipotensão se mostra de fácil recuperação e não letal.

Foi realizada a comparação dos tempos recuperação da PAM na primeira administração de MNPs no grupo 1 com a administração de MNPs no grupo 2, como mostra a figura 33.

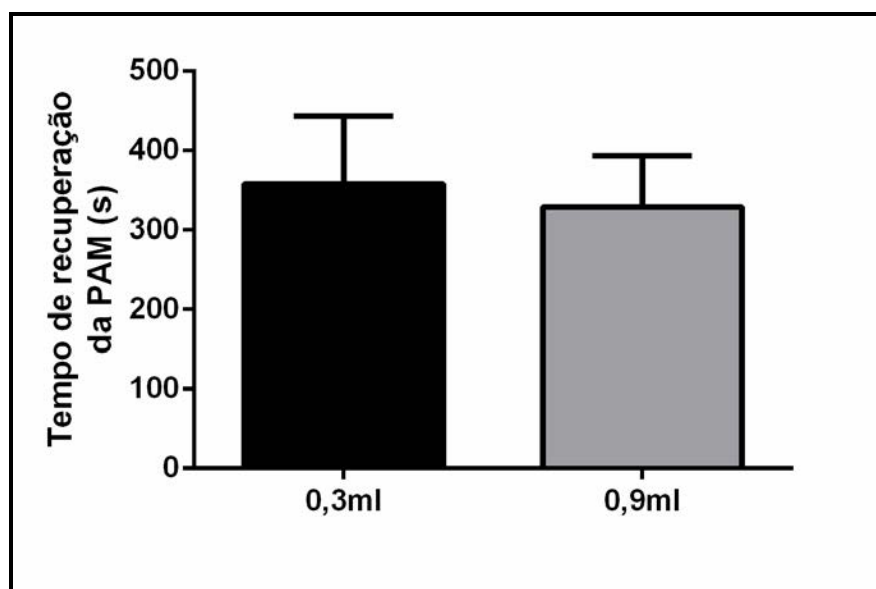


Figura 33 - Médias dos tempos de recuperação da hipotensão máxima observada em cada grupo

A comparação exposta na figura 33 mostra que não existiram diferenças significativas entre os tempos de recuperação da primeira administração de MNPs no grupo 1 e a administração realizada no grupo 2. A partir deste dados, e de anteriores, pode-se concluir que a dose de MNPs não influencia diretamente nos parâmetros hemodinâmicos, pois em todas as comparações hemodinâmicas realizadas entre as primeiras administrações de 0,3ml e as administrações de 0,9ml de MNPs, não existiram diferenças significativas, o que indica a possibilidade de que o fator

preponderante nas alterações hemodinâmicas, é a presença de MNPs na corrente sanguínea, e não a dose.

A figura 34 e 35 mostram que a primeira administração endovenosa de MNPs, em ambos os grupos, causou pequenas alterações na FC.

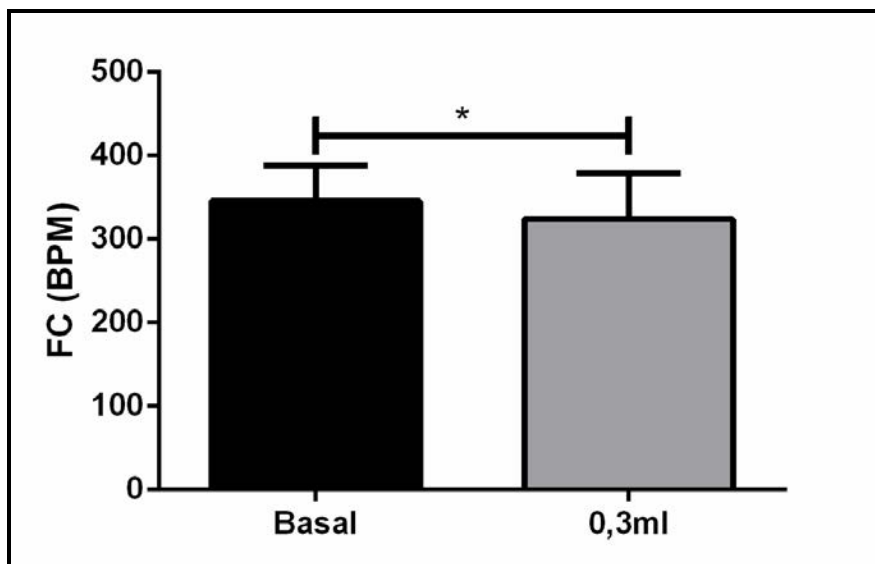


Figura 34 - Média da FC sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs no grupo 1.

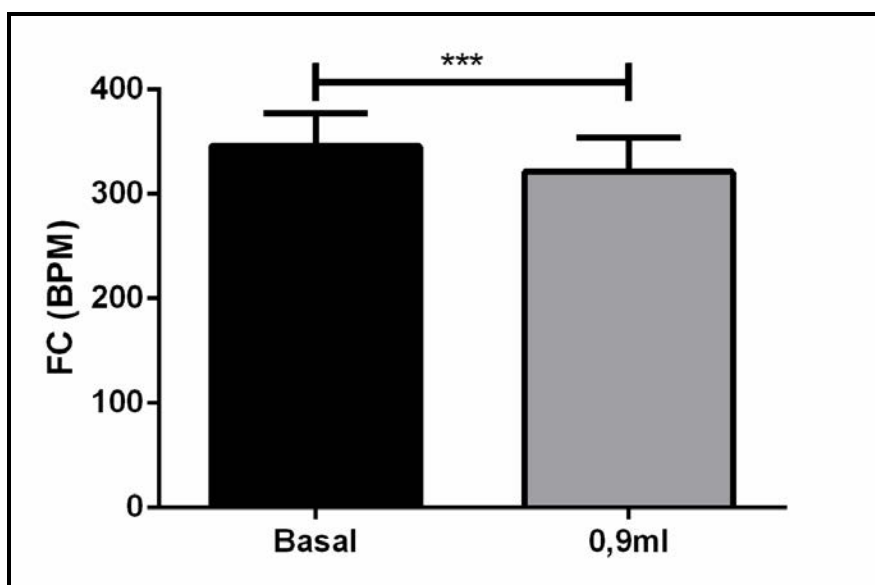


Figura 35 - Média de FC sem MNPs (basal) e após a administração de 0,9ml de MNPs no grupo 2.

As figuras 34 e 35 mostraram que a média da FC cardíaca obteve uma pequena queda, porém significativa ($p=0,0184$ para o grupo 1 e $p=0,0003$ para o grupo 2). Na primeira administração de MNPs no grupo 1 a FC teve aproximadamente $-7 \pm 2\%$ de

queda. Enquanto que no grupo 2, a administração de 0,9ml de MNPs apresentou uma queda de aproximadamente $-7 \pm 1\%$. Porém esse parâmetro (FC) é passível de alta variabilidade e apresenta valores muito diferentes ao longo do dia para o mesmo animal. A partir desta afirmação e observando as mínimas variações encontradas, foi realizado um teste estatístico de colunas nas três administrações do grupo 1, onde foi observado se essa variação encontrada é diferente de zero (figura 36).

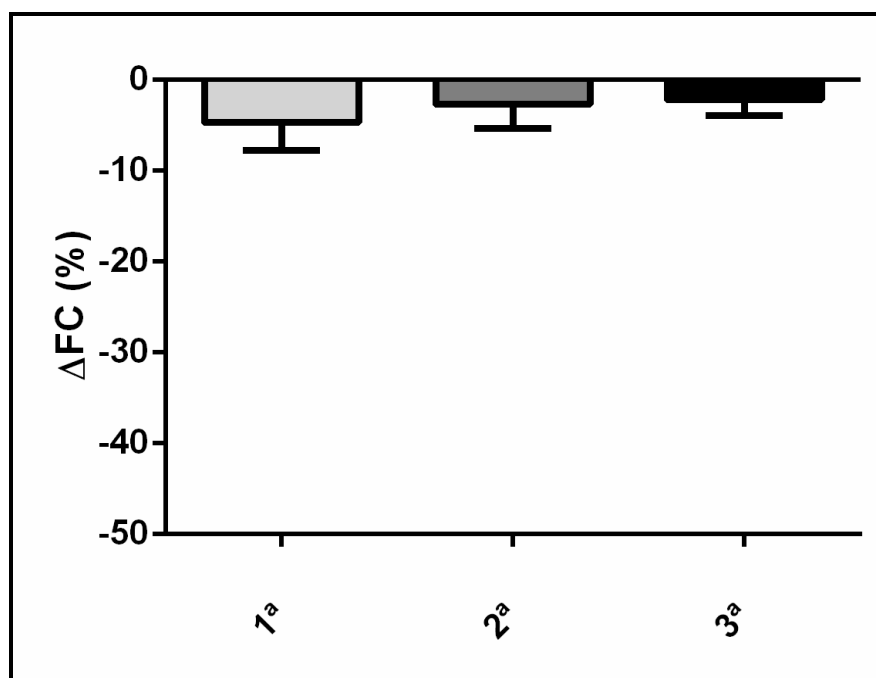


Figura 36 - Média da porcentagem de alteração da FC em cada uma das administrações de MNPs no grupo 1.

A figura 36 mostra as variações de FC em cada uma das administrações do grupo 1. A estatística de coluna comparou cada valor de variação de FC com o valor hipotético, sendo neste caso o valor hipotético igual à zero, e não obteve diferenças estatísticas significativas, ou seja, apesar da figura 34 e 35 apresentarem uma queda significativa na FC, essas variações ao longo das administrações consecutivas, não diferiram de zero. Esses dados mostram que se essa variação existe, ela é mínima, não diferindo de zero no teste estatístico de colunas. Uma vez que as MNPs se mostram quase que inertes sobre a FC, isso sugere um perfil seguro de administração endovenosa das MNPs do ponto de vista da FC.

Foram, também, realizadas quantificações de arritmias cardíacas por meio de análise de perfil elétrico cardíaco. A figura 37 quantifica as arritmias encontradas no período pré administração e após a primeira administração de MNPs no grupo 1.

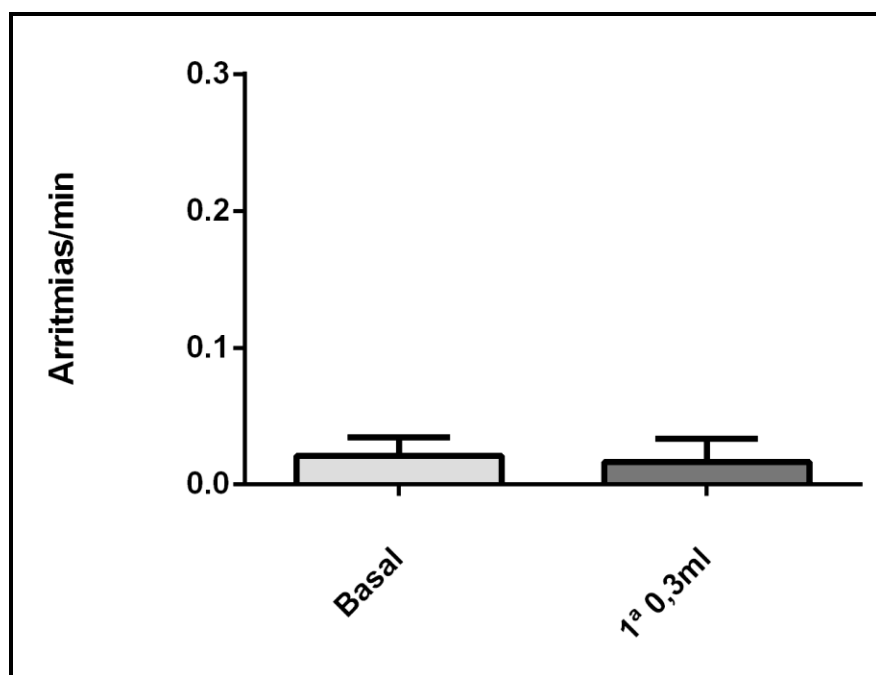


Figura 37 - Arritmias cardíacas no período pré administração e após a primeira administração de MNPs nos animais do grupo 1.

A figura 38 apresenta os valores de arritmia por minuto encontrados no período pré administração de MNPs e após a administração de 0,9ml de MNPs nos animais do grupo 2.

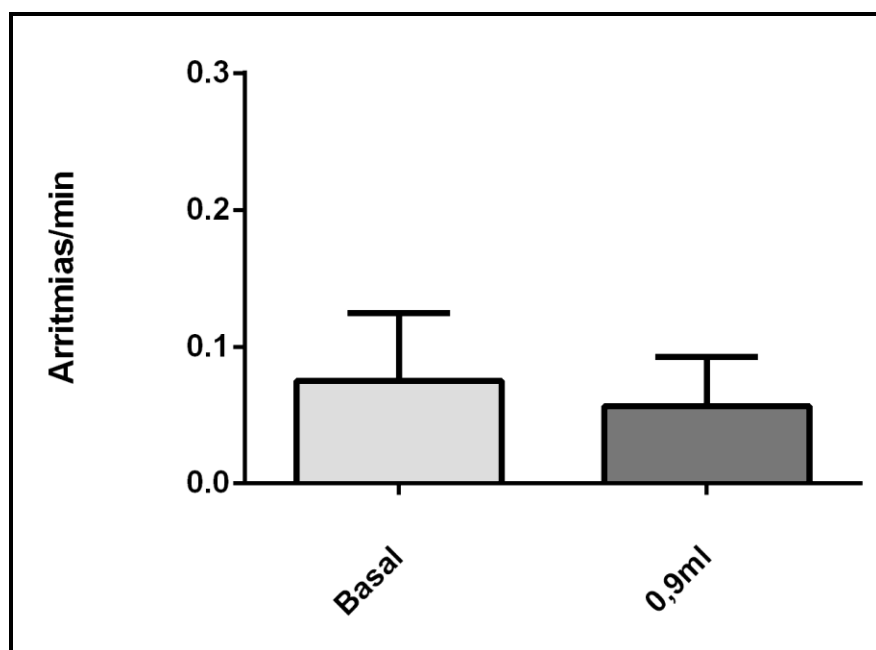


Figura 38 - Arritmias cardíacas no período pré administração e após a administração de MNPs nos animais do grupo 2.

As arritmias encontradas em cada uma das administrações nos animais do grupo 1 estão apresentadas na figura 39.

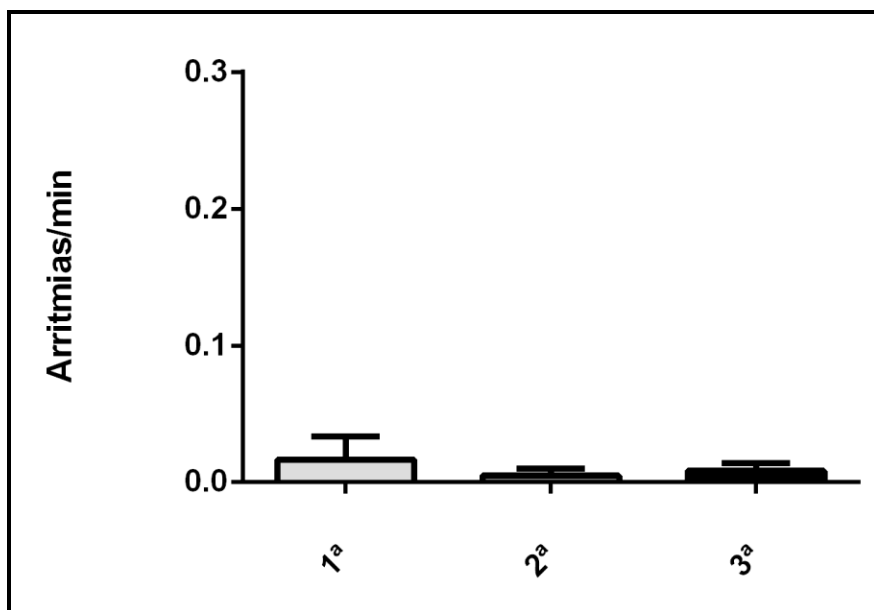


Figura 39 - Arritmias cardíacas encontradas em cada administração de MNPs nos animais do grupo 1.

As análises de perfil elétrico cardíaco, apresentadas na forma de arritmias por minutos, não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação aos valores encontrados no período pré-administração, como pode ser observado nas figuras 37 e 38. A figura 39, que apresenta os valores de arritmia por minuto nas três administrações consecutivas de MNPs, mostra que também não existiram diferenças estatísticas entre a primeira e as demais administrações. Os dados apresentados nas figuras 37, 38 e 39 solidificam a hipótese de que a administração endovenosa das MNPs utilizadas neste trabalho não causa arritmia cardíaca no animal, mostrando um perfil seguro de administração do ponto de vista do perfil elétrico cardíaco.

5 Conclusão

Conclui-se, então, que o sistema BAC obteve bom rendimento quando aplicado para o monitoramento das MNPs no sistema circulatório de pequenos animais. O sistema foi capaz de detectar as MNPs na circulação sanguínea, detectar a chegada das MNPs no coração e inferir sobre o perfil de captação e retenção das MNPs pelo organismo em tempo real pela avaliação do perfil de decaimento do sinal, avaliações que não eram possíveis até o momento devido à falta de instrumentação com alta resolução temporal e capacidade de aquisição *online*. Também concluiu-se que o sistema BAC é capaz de detectar pequenos volumes de MNPs perfundidas em órgãos e tecidos, fazendo um paralelo com a instrumentação encontrada na área de medicina nuclear, porém sem o uso de radiação ionizante e com um menor custo. A BAC se mostra vantajosa neste tipo de análise, já que outras metodologias que utilizam o princípio de ressonância magnética (como a relaxometria ou a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)) são de alto custo, complexas e não são capazes de obterem dados *online* ligados à dinamicidade das MNPs no organismo do animal vivo.

O sistema BAC também obteve ótima performance quando comparado com a técnica de EPR na avaliação do destino final das MNPs no organismo do animal. O sistema BAC apresentou uma ótima correlação linear com a técnica de EPR e as análises de concordância de Bland Altman corroboram a validação da BAC para análises de biodistribuição. A BAC ainda obtém vantagens sobre o sistema de EPR no que diz respeito às suas características de viabilidade, pois apresenta menor custo e portabilidade.

O perfil de biodistribuição mostrou maior retenção de MNPs no fígado, pulmão e baço, respectivamente, devido às características morfofisiológicas destes órgãos. A partir destes dados, o sistema se mostrou capaz, também, de avaliar a biodistribuição das MNPs no organismo do animal através da quantificação do sinal da BAC referente a cada órgão coletado, viabilizando uma nova ferramenta em estudos de biodistribuição e perfusão de órgãos e sistemas.

As MNPs utilizadas neste trabalho (MnFe_2O_4 – recobertas com citrato) apresentaram uma meia vida na circulação de aproximadamente 580 segundos na

primeira administração, num período de aquisição de sinais de aproximadamente 30 minutos, o que torna viável a sua utilização como contraste em estudos fisiológicos onde o marcador, ou traçador, necessita de características como tamanho reduzido, dinamicidade e tempo de meia vida eficiente. MNPs semelhantes já são utilizadas como contraste na área de ressonância magnética e se mostraram como um contraste seguro, bem tolerado e com bons resultados, sendo eliminados da circulação após certo período de tempo (KONG et al., 2012; NUNES et al., 2014; WAGNER et al., 2002; WUNDERBALDINGER et al., 2002b).

Na primeira administração no grupo 1 e na administração no grupo 2, o efeito hipotensor se manifestou entre o 1º e 2º minuto. Nas segundas e terceiras administrações no grupo 1 esse efeito se mostrou mais rápido, se manifestando em torno de 20 segundos após a administração. Após a 1ª administração a PAM retorna em aproximadamente 5 minutos aos valores basais, enquanto que nas administrações seguintes esse intervalo é muito menor, em torno de 35 segundos. A administração endovenosa não promove alterações bruscas na FC, muito menos no perfil elétrico cardíaco. Apesar de ter sido observada uma hipotensão, ela se mostrou transitória e de fácil e rápida recuperação, o que faz com que a administração endovenosa das MNPs seja relativamente segura. Ainda que neste trabalho tenha sido encontrada essa hipotensão transitória e leve alteração da FC, na literatura existem trabalhos de impacto que não encontraram essas alterações (NUNES et al., 2014). Porém no presente estudo as doses utilizadas foram maiores e com uma taxa de administração diferente de trabalhos anteriores, além de utilizar um tipo diferente de anestésico, mais potente, que deprime o sistema nervoso central, responsável pelo controle de uma série de mecanismos hemodinâmicos e cardiovasculares.

Os resultados obtidos até o presente momento sugerem fortemente o uso da técnica BAC como método de avaliação destes parâmetros e motivam ensaios adicionais visando futuras caracterizações pré-clínicas de MNPs em termos de $T_{1/2}$ e perfis de biodistribuição. Sendo assim, a Biosusceptometria AC oferece uma valiosa alternativa na área devido às características intrínsecas da técnica (aquisição *online*, resolução temporal, custo e invasividade baixos). Dentro deste contexto, este trabalho se mostra relevante, uma vez que há uma grande quantidade de tipos de MNPs disponíveis na literatura a serem testadas, órgãos a serem perfundidos e monitorados em situações normais e alteradas, além de inúmeras possibilidades de marcação de tecidos como

tumores e células tronco. Em adição, as avaliações realizadas ainda podem ser aprimoradas, utilizando uma bomba de infusão mecânica, diferentes conjugações de MNPs que inefiram de formas diferentes na PAM e comparação dos resultados obtidos com outras técnicas padrão.

6 Referências bibliográficas

- AGOSTINHO, M. et al. Ac biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2010, p. 5740-3, 2010a.
- AMERICO, M. F. et al. Scintigraphic validation of ac biosusceptometry to study the gastric motor activity and the intragastric distribution of food in humans. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 804-11, 2007.
- ANDREIS, U. et al. Gastric motility evaluated by electrogastrography and alternating current biosusceptometry in dogs. **Physiol Meas**, v. 29, p. 1023-31, 2008.
- AXEL, L. Blood-flow effects in magnetic-resonance imaging. **American Journal of Roentgenology**, v. 143, p. 1157-1166, 1984.
- BAFFA, O. et al. Analysis and development of ac biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements. **Med Biol Eng Comput**, v. 33, p. 353-7, 1995.
- BAKUZIS, A. F. et al. Chain formation and aging process in biocompatible polydisperse ferrofluids: Experimental investigation and monte carlo simulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 191, p. 1-21, 2013.
- BAKUZIS, A. F.; MORAIS, P. C.; PELEGRINI, F. Surface and exchange anisotropy fields in mnfe_2o_4 nanoparticles: Size and temperature effects. **Journal of Applied Physics**, v. 85, p. 7480-7482, 1999.
- BELLIVEAU, J. W. et al. Functional cerebral imaging by susceptibility-contrast nmr. **Magn Reson Med**, v. 14, p. 538-46, 1990.
- BENMAIR, Y. et al. Study of gastric-emptying using a ferromagnetic tracer. **Gastroenterology**, v. 73, p. 1041-1045, 1977a.
- BENMAIR, Y. et al. Evaluation of a magnetic method for measurement of small intestinal transit-time. **American Journal of Gastroenterology**, v. 68, p. 470-475, 1977b.
- BERGEMANN, C. et al. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 45-52, 1999.
- BERNARD, S. L. et al. High spatial resolution measurements of organ blood flow in small laboratory animals. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, p. H2043-52, 2000.
- BRANQUINHO, L. C. et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2013.
- BRANQUINHO, L. C. et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia (vol 3, 2887, 2013). **Scientific Reports**, v. 4, p. 2014.
- BULTE, J. W. M. et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 1141-1147, 2001.
- CANNON, J. A. et al. Experience with a new electro-magnetic flow-meter for use in blood-flow determinations in surgery. **Ann Surg**, v. 152, p. 635-47, 1960.
- CARRIAO, M. S.; NETO, K. S.; BAKUZIS, A. F. Mass magnetophoretic experiment applied to the separation of biocompatible magnetic nanoparticles with potential

- for magnetohyperthermia. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 47, p. 2014.
- CHEN, L. T.; WEISS, L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. **Blood**, v. 41, p. 529-37, 1973.
- CHERTOK, B. et al. Comparison of electron spin resonance spectroscopy and inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy for biodistribution analysis of iron-oxide nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, p. 375-385, 2010.
- CHERTOK, B. et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for mri monitored magnetic targeting of brain tumors. **Biomaterials**, v. 29, p. 487-496, 2008.
- CHOI, H. S. et al. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1165-70, 2007.
- COLE, A. J. et al. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating peg-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6291-301, 2011.
- CORA, A. et al. Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry. **Physics in Medicine and Biology**, v. 50, p. 5523-5534, 2005a.
- CORA, L. A. et al. Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current biosusceptometry. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 56, p. 413-20, 2003.
- CORA, L. A. et al. Pharmaceutical applications of ac biosusceptometry. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 74, p. 67-77, 2010.
- CORA, L. A. et al. Influence of compression forces on tablets disintegration by ac biosusceptometry. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 372-379, 2008.
- CORA, L. A. et al. Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by ac biosusceptometry. **Eur J Pharm Sci**, v. 27, p. 1-8, 2006.
- CORA, L. A. et al. Ac biosusceptometry in the study of drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, p. 1223-41, 2005b.
- DAGHASTANLI, N. A. et al. Oesophageal transit time evaluated by a biomagnetic method. **Physiol Meas**, v. 19, p. 413-20, 1998.
- ECKENHOFF, J. E.; HAFKENSCHIEL, J. H.; ET AL. The measurement of coronary blood flow by the nitrous oxide method. **Am J Med Sci**, v. 214, p. 693, 1947.
- FONSECA, P. R. Imaging regular phantoms through acb tomography. **18th International Conference on Medical Physics**, v. p. 2011.
- GAMARRA, L. F. et al. Quantitative ferromagnetic resonance analysis of cd133 stem cells labeled with iron oxide nanoparticles. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 20, p. 2008.
- GILL, R. W. Measurement of blood-flow by ultrasound - accuracy and sources of error. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 11, p. 625-641, 1985.
- GOODWILL, P. W. et al. Narrowband magnetic particle imaging. **Ieee Transactions on Medical Imaging**, v. 28, p. 1231-1237, 2009.
- HAFELI, U. O. et al. Optical method for measurement of magnetophoretic mobility of individual magnetic microspheres in defined magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 224-239, 2005.

- KETTERING, M. et al. Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumour cells: An in vitro study. **Nanotechnology**, v. 18, p. 2007.
- KETY, S. S. The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues. **Pharmacol Rev**, v. 3, p. 1-41, 1951.
- KONG, S. D. et al. Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood-brain barrier. **J Control Release**, v. 164, p. 49-57, 2012.
- KRAUSE, H. J. et al. Magnetic particle detection by frequency mixing for immunoassay applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 436-444, 2007.
- KRISTENSEN, J. K.; WADSKOV, S. Studies on ¹³³Xe wash-out from human skin: Quantitative measurements of blood flow in normal and corticosteroid-treated skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 68, p. 196-200, 1977.
- LEE, J. H. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. **Nature Medicine**, v. 13, p. 95-99, 2007.
- LEWIN, M. et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 410-414, 2000.
- LOICHEN, J.; HARTMANN, U. Cell-surface interactions involving immobilized magnetite nanoparticles on flat magnetic substrates. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 38, p. 891-901, 2009.
- LUBBE, A. S.; ALEXIOU, C.; BERGEMANN, C. Clinical applications of magnetic drug targeting. **Journal of Surgical Research**, v. 95, p. 200-206, 2001.
- MARCIANI, L. Assessment of gastrointestinal motor functions by mri: A comprehensive review. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 23, p. 399-407, 2011.
- MARCUS, M. L.; WILSON, R. F.; WHITE, C. W. Methods of measurement of myocardial blood-flow in patients - a critical-review. **Circulation**, v. 76, p. 245-253, 1987.
- MIQUELIN, C. A. et al. Pharyngeal clearance and pharyngeal transit time determined by a biomagnetic method in normal humans. **Dysphagia**, v. 16, p. 308-12, 2001.
- MIRANDA, J. R. A. et al. Susceptometric measurement of gastric-emptying. **Biomagnetism : Clinical Aspects**, v. 988, p. 635-638, 1992.
- MIRANDA, J. R. A. et al. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, p. 1791-1799, 1997.
- MORAES, R. et al. Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of ac biosusceptometry. **Physiol Meas**, v. 24, p. 337-45, 2003.
- MOREIRA, M.; MURTA, L. O.; BAFFA, O. Imaging ferromagnetic tracers with an ac biosusceptometer. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 71, p. n. 6, 2000.
- NUNES, A. D. et al. Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 3299-312, 2014.
- OLIVEIRA, R. B. et al. Evaluation of a biomagnetic technique for measurement of oro-caecal transit time. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 491-5, 1996.
- OLIVEIRA, R. B. et al. A biomagnetic technique for oro-caecal transit-time measurement. **Biomagnetism : Clinical Aspects**, v. 988, p. 631-634, 1992.
- OLSON, T. P. et al. Effects of respiratory muscle work on blood flow distribution during exercise in heart failure. **J Physiol**, v. 588, p. 2487-501, 2010.
- OVITT, T. W. et al. Intravenous angiography using digital video subtraction: X-ray imaging system. **AJR Am J Roentgenol**, v. 135, p. 1141-4, 1980.

- PAIXAO, F. C. et al. A novel biomagnetic instrumentation with four magnetoresistive sensors to evaluate gastric motility. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2007, p. 2215-8, 2007.
- PAIXAO, F. C. et al. A novel device with 36 channels for imaging and signal acquisition of the gastrointestinal tract based on ac biosusceptometry. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2010, p. 6457-60, 2010.
- PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.
- QUINI, C. C. et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. **J Biol Eng**, v. 6, p. 6, 2012.
- QUINI, C. C. et al. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. p. 2014.
- RIVA, C.; BENEDEK, G. B.; ROSS, B. Laser doppler measurements of blood-flow in capillary tubes and retinal arteries. **Investigative Ophthalmology**, v. 11, p. 936-&, 1972.
- RODRIGUES, H. F. et al. Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, p. 752-767, 2013.
- RUDOLPH, A. M.; HEYMANN, M. A. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. **Circ Res**, v. 21, p. 163-84, 1967.
- SCHALLER, V. et al. Motion of nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient. **Journal of Applied Physics**, v. 104, p. 2008.
- SEJRSEN, P. Measurement of cutaneous blood flow by freely diffusible radioactive isotopes. Methodological studies on the washout of krypton-85 and xenon-133 from the cutaneous tissue in man. **Dan Med Bull**, v. 18, p. Suppl 3:9-38, 1971.
- SUN, C.; LEE, J. S.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in mr imaging and drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, p. 1252-65, 2008.
- TANAKA, T. et al. Measurements of blood-flow in human retinal blood-vessels using laser doppler velocimetry. **Bulletin of the American Physical Society**, v. 19, p. 480-480, 1974.
- TAUPITZ, M. et al. New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (vsop) as contrast medium for mr angiography: Preclinical results in rats and rabbits. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 12, p. 905-911, 2000.
- ULMER, S. et al. Intraoperative dynamic susceptibility contrast mri (idsc-mri) is as reliable as preoperatively acquired perfusion mapping. **Neuroimage**, v. 49, p. 2158-2162, 2010.
- WAGNER, S. et al. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging - preclinical in vivo characterization. **Investigative Radiology**, v. 37, p. 167-177, 2002.
- WENGER, M. A. et al. Stomach motility in man as recorded by magnetometer method. **Gastroenterology**, v. 41, p. 479-&, 1961.
- WENGER, M. A.; HENDERSON, E. B.; DINNING, J. S. Magnetometer method for recording gastric motility. **Science**, v. 125, p. 990-991, 1957.

- WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. **Bioconjug Chem**, v. 13, p. 264-8, 2002a.
- WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. **Bioconjug Chem**, v. 13, p. 264-268, 2002b.

Apêndice

Este apêndice expõe os dados de um experimento paralelo realizado, no qual as MNPs não passaram por tratamento de sonicação e filtração. Este experimento foi realizado a fim de se estudar as consequências biológicas da falta de tratamento (sonicação e filtração) das MNPs quando administradas em animais. Apesar de efeitos de formação de agregados das MNPs já terem sido descritas por Branquinho e colaboradores em 2013, não foram encontrados dados sobre o efeito biológico (talvez tóxico) da administração das MNPs neste estado não tratado.

Passagem das nanopartículas no coração do animal

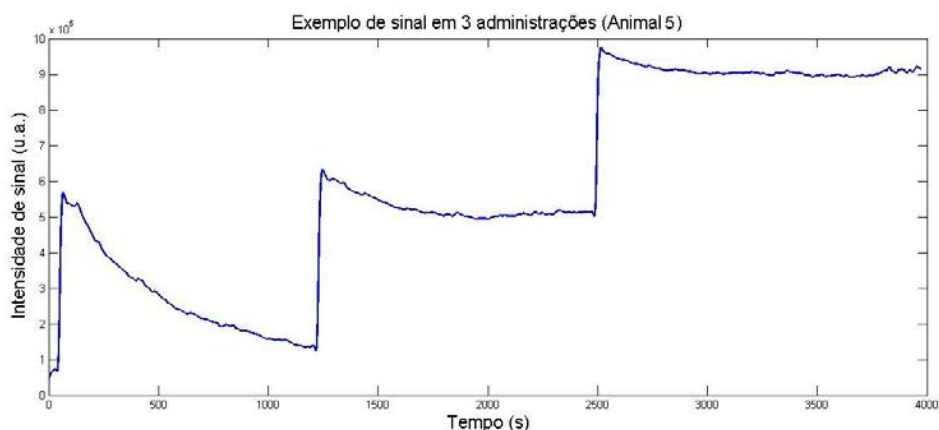


Figura 1 - Exemplo de morfologia do sinal em administrações seriadas de MNPs, e seus efeitos de saturação de captação pelos órgãos responsáveis.

A figura 1 apresenta um exemplo de sinal adquirido em três administrações consecutivas de MNPs não tratadas, ilustrando o perfil de saturação de captação dos órgãos responsáveis e consequente alteração no decaimento da curva. Pode-se observar, também, no exemplo da figura 6 que o segundo pico, que representa a segunda administração de MNPs, apresenta um valor de I_e (referente à estabilização do sinal da BAC que não ocorreu nos animais em que as MNPs passaram por processo de sonicação e filtração) menor do que o observado na primeira administração, evidenciando a saturação de captação pelos órgãos responsáveis. Na terceira administração, terceiro pico, o valor de I_e é menor ainda, ou seja, os órgãos de captação e retenção se mostram quase saturados por completo. Pode-se verificar ainda, que os

valores de I_p tendem a crescer, o que mostra a remanescência de MNPs no sangue do animal.

Como se pode observar na figura 2, as médias de ΔI_e , referentes à saturação de captação de MNPs, se mostraram estatisticamente diferentes entre a primeira administração e as demais, sendo que não houveram diferenças entre a segunda e terceira administração.

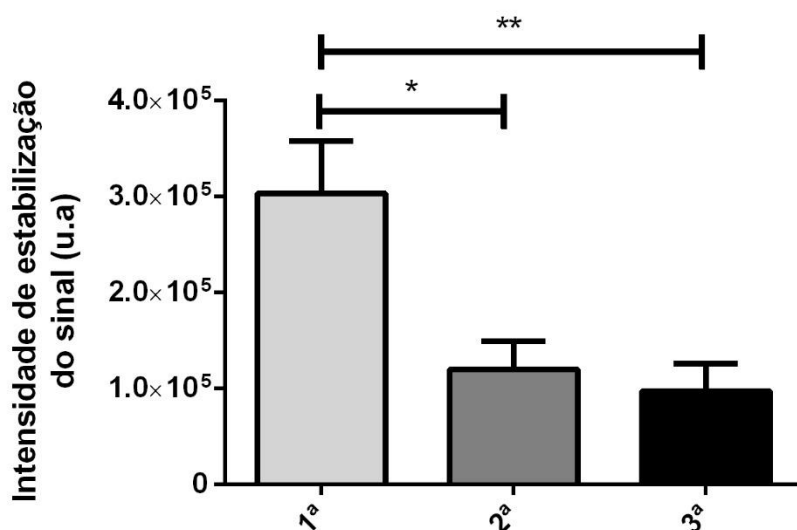


Figura 2 - Médias da intensidade de estabilização do sinal (I_e) da BAC, referente à saturação de captação das MNPs pelos órgãos responsáveis. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$.

Os dados apresentados na figura 2 mostram que o valor de I_e diminui com as administrações consecutivas de MNPs, mostrando que na primeira administração, onde os sítios de retenção e captação não estavam saturados, houve uma grande captação, o que aumentou o valor de I_e , enquanto que nas administrações seguintes, esses mesmos sítios apresentavam perfis de saturação, o que ocasionou em menor retirada de MNPs da circulação e consequente menor variação da intensidade de estabilização do sinal. Não existiram diferenças significativas entre a segunda e terceira administrações, isso pode ter ocorrido pelo fato de que as MNPs possuem uma distribuição dimensional em forma de gaussiana, implicando na presença de MNPs menores do que 5,5 nm, tamanho esse que permite a filtração de uma parte das MNPs por clearance renal (CHOI et al., 2007; SUN et al., 2008), que devido às próprias características intrínsecas deste mecanismo de depuração, não apresenta perfil de saturação, o que faz com que nas segundas e terceiras administrações as quantidades de MNPs retiradas do sangue sejam parecidas.

Os valores de I_p são diretamente dependentes dos valores de I_e , pois quanto menor a retirada de MNPs do sangue, maior o sinal referente à permanência de MNPs na circulação, o que explica as diferenças, encontradas estatisticamente, presentes no gráfico apresentado na figura 3.

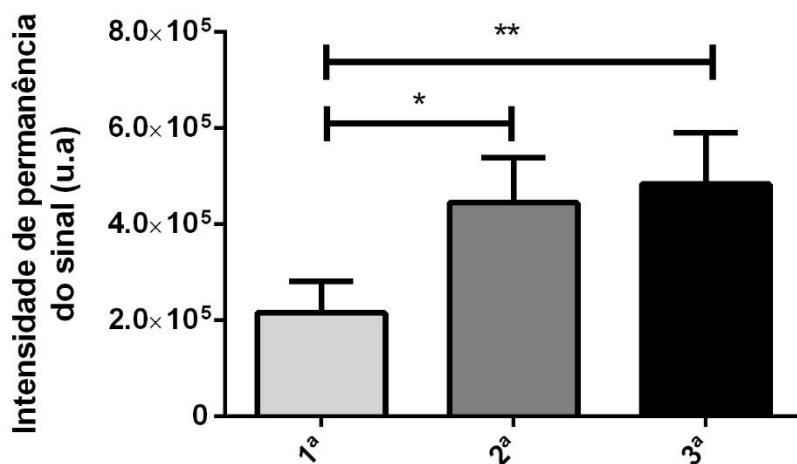


Figura 3 - Médias das intensidades de sinal referentes à permanência (I_p) de MNPs na circulação do animal. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$.

Os valores dos $T_{1/2}$ encontrados nas três administrações são apresentados na figura 4.

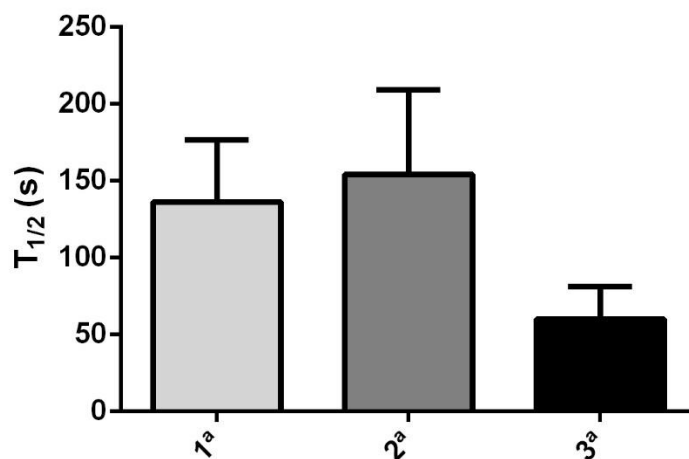


Figura 4 - Médias dos $T_{1/2}$ encontrados em cada administração das MNPs.

Apesar da dinâmica de decaimento do sinal do sistema BAC ser alterada conforme se administra consecutivamente as MNPs, as médias de $T_{1/2}$ não apresentaram diferenças significativas, como mostra a figura 4. Em relação ao $T_{1/2}$ esses dados podem

estar associados ao fato de que mesmo que a intensidade de sinal diminua pouco, a velocidade de queda também é menor, o que faz com que as médias de $T_{1/2}$ não se diferenciem estatisticamente, diferentemente do que ocorreu nos animais onde as MNPs passaram por processos de filtração e sonicação (tratadas).

Encontrou-se, então, um $T_{1/2}$ médio de 136 ± 40 s para a primeira administração, um $T_{1/2}$ médio de 154 ± 55 s para a segunda administração e um $T_{1/2}$ médio de 60 ± 21 s para a terceira administração. Esses valores se apresentaram muito menores do que os valores encontrados nos animais descritos no corpo do texto principal deste trabalho. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que MNPs maiores do que 200nm serem aprisionadas na primeira passagem no baço e fígado (CHOI et al., 2007; SUN et al., 2008).

Biodistribuição

Os valores médios encontrados a partir dos sinais absolutos da BAC referentes à biodistribuição para cada órgão coletado estão apresentados na figura 5.

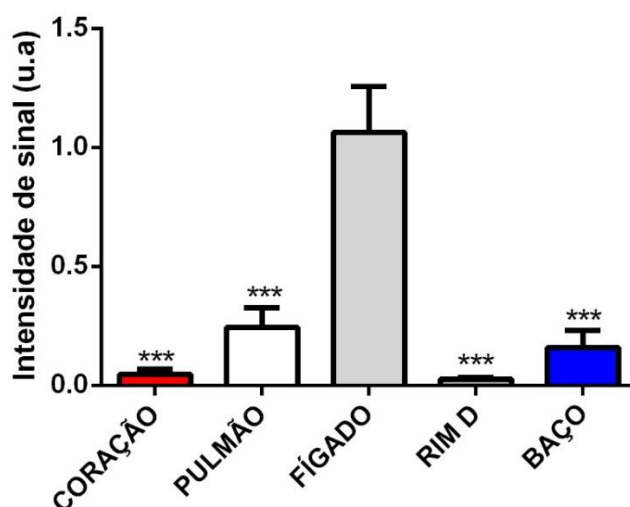


Figura 5 - Valores de sinais absolutos adquiridos pela BAC referentes às quantidades de MNPs retidas em cada órgão. (***) $p < 0,001$ em relação à barra que não possui asteriscos.

A figura 6 mostra as porcentagens de contribuição do sinal de cada órgão na soma das intensidades de todos os órgãos para cada animal.

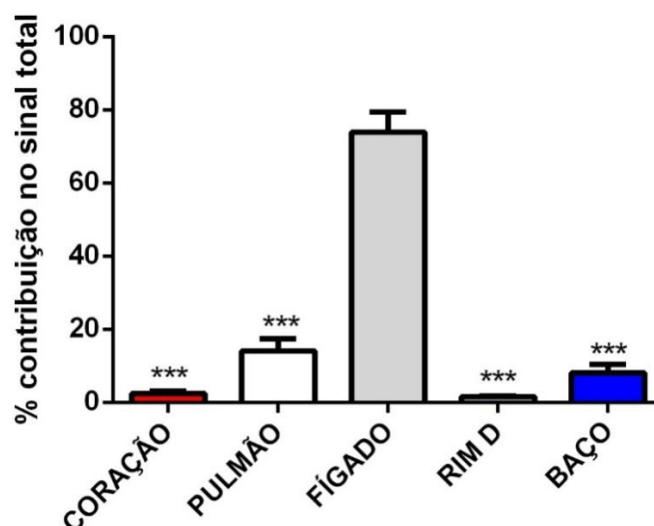


Figura 6 - Porcentagem da contribuição de cada órgão na soma do sinal de todos os órgãos de cada animal. (***) $p < 0,001$ em relação à barra que não possui asteriscos.

A biodistribuição predominante se deu para o fígado, porém foram encontrados acúmulos significativos no pulmão e baço, como pode ser observado na figura 12 e 13. A normalização percentual realizada mostrou a proporcionalidade na distribuição do volume total de MNPs medido no organismo do animal. Os valores de sinal relacionados com a presença de material magnético nos pulmões desses animais, que receberam as MNPs não tratadas, foram muito maiores do que nos animais que receberam as MNPs tratadas (grupo 1), chegando a quase o dobro de sinal. Isso pode ter ocorrido pela formação de agregados produzir mais MNPs de tamanho incompatível com a passagem nos capilares pulmonares. Essa é uma das maiores preocupações com o não tratamento das MNPs, pois os pulmões, apesar de serem responsáveis por parte da metabolização de substâncias como fármacos e drogas, se mostrou prejudicado, já que foi observado, visualmente, dificuldade de respiração nesses animais.

Análises Cardiovasculares

Nas primeiras administrações de MNPs não tratadas via endovenosa, encontrou-se uma hipotensão transitória com uma queda de aproximadamente 48% da PAM em níveis pré-administração, como mostra a figura 7.

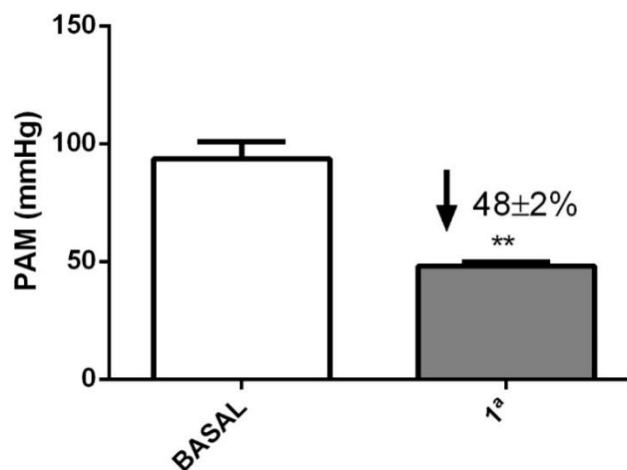


Figura 7 - Média da PAM sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs. (**)p<0,01.

A figura 8 apresenta a média das porcentagens da variação da PAM em administrações consecutivas.

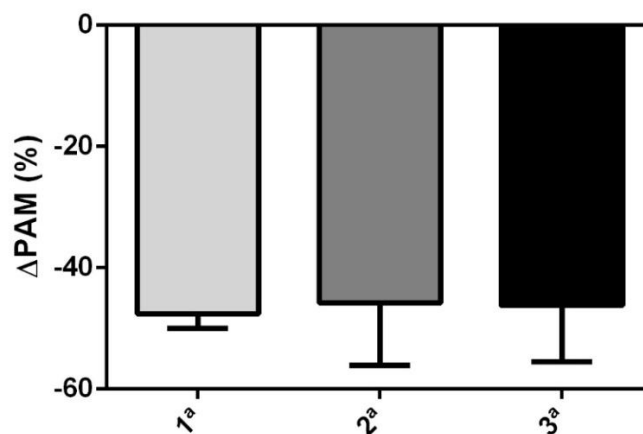


Figura 8 - Médias da PAM em cada uma das administrações de MNPs.

O teste estatístico aplicado não encontrou diferenças significativas entre as diferentes administrações, o que significa que administrações causam queda da PAM com mesma intensidade em todas as administrações, o que se diferencia nos animais que receberam as MNPs filtradas e sonicadas, onde as quedas na PAM referentes às segundas e terceiras administrações foram muito menores do que nas primeiras administrações.

Os tempos de manifestação do pico de hipotensão encontrados estão apresentados na figura 9.

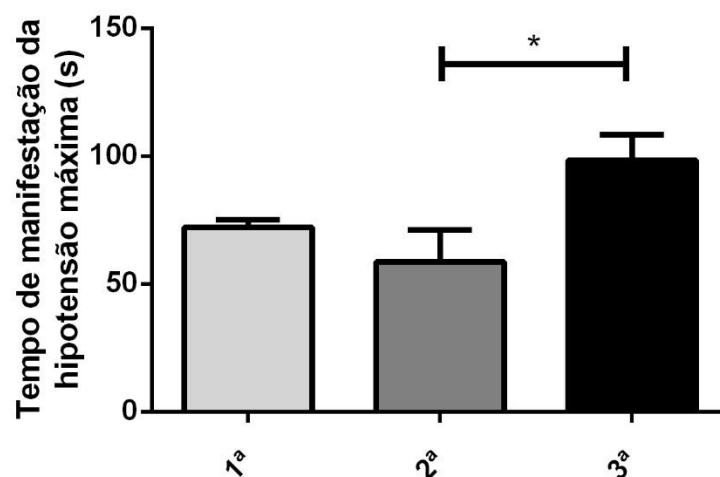


Figura 9 - Médias dos tempos de manifestação da hipotensão máxima observada. (*) $p < 0,05$.

Não existiram diferenças significativas nas manifestações de hipotensão entre a primeira e segunda administração, porém os tempos de manifestação encontrados nas terceira administração diferem estatisticamente das segunda administração. A ocorrência dessa diferença estatística encontrada pode ser explicada pela biodisponibilidade de óxido nítrico, ou outros agentes de regulação pressórica, no organismo do animal, ou seja, nas primeira administração as células endoteliais dos vasos apresentavam grande biodisponibilidade de agentes de regulação pressórica e consequentemente a liberação destes agentes foi maior do que na última administração, onde a reserva pode ter diminuído consideravelmente. Estes dados também diferiram do perfil encontrado nos animais que receberam as MNPs tratadas, onde foram encontrados diferentes valores de manifestação da queda da PAM.

Os tempos de recuperação da PAM estão apresentados na figura 10.

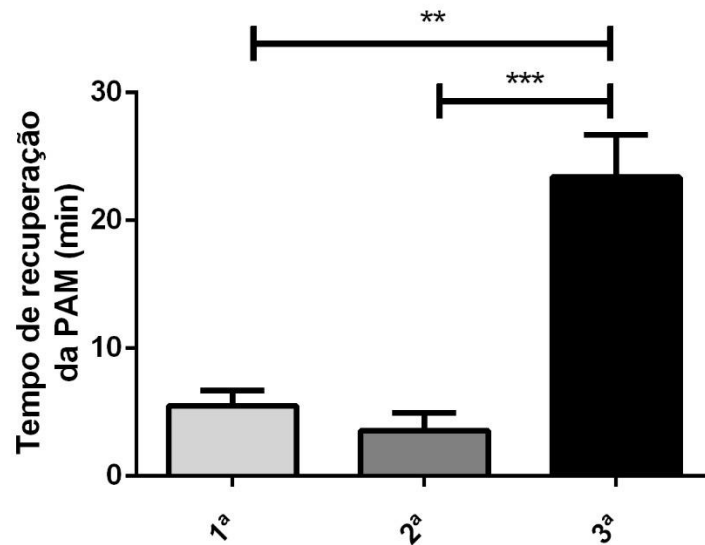


Figura 10 - Médias dos tempos de retorno da PAM aos níveis pré-administração em cada uma das administrações. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$.

O tempo de recuperação da PAM à níveis pré-administração foi de aproximadamente $5,4 \pm 1,2$ minutos na primeira administração e $3,5 \pm 1,4$ minutos na segunda administração e $23,3 \pm 3,3$ minutos na terceira administração, como pôde-se observar na figura 10, diferindo dos valores encontrados nos animais que recebem as MNPs tratadas. O tempo de recuperação da queda de PAM está intrinsecamente ligado ao tempo que as MNPs permanecem na circulação do animal, e como existe saturação de captação nas últimas administrações, as MNPs não tratadas não são retiradas da circulação, como foi mostrado no exemplo de sinal com três infusões na figura 1, o que pode fazer com que o tempo de recuperação na terceira administração se prolongue.

A figura 11 e 12 mostram que, apesar de existir a presença da hipotensão transitória, a administração endovenosa, de MNPs não tratadas, não causou alterações na FC e no perfil elétrico cardíaco.

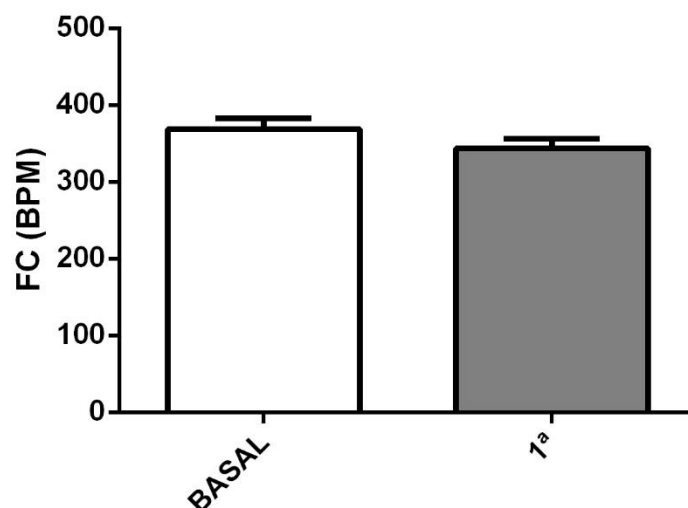


Figura 11 - Média da FC sem MNPs (basal) e após a primeira administração de MNPs.

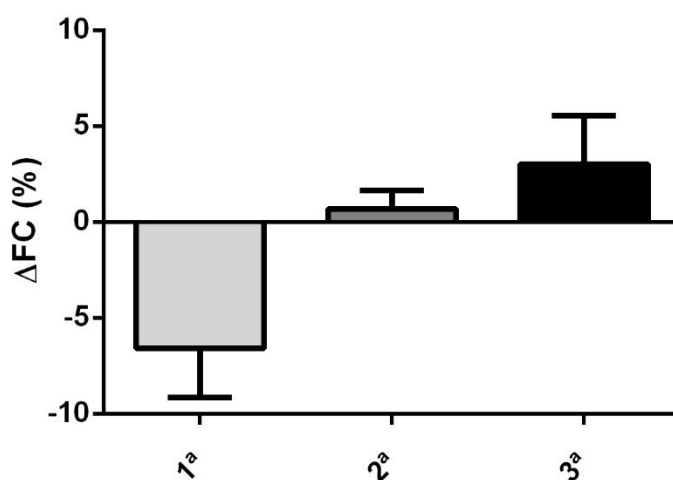


Figura 12 - Média da FC em cada uma das administrações de MNPs.

Da mesma forma que não existiram alterações significativas da FC e do perfil elétrico cardíaco nas primeiras administrações, a figura 12 mostra que também não existiram alterações significativas nas segunda e terceira administrações, o que sugere que as MNPs não tratadas, durante sua passagem pelo coração, não sensibilizam o nodo sinoatrial ou o nodo atrioventricular.

Óbitos

Os dados apresentados neste apêndice são referentes aos animais que sobreviveram às três administrações de MNPs não tratadas. Porém existiram animais que não sobreviveram às administrações (uma, duas ou três) de MNPs não tratadas.

Foi encontrado aproximadamente 45% de óbitos na administração por via endovenosa das MNPs não tratadas.

Esse elevado índice de óbitos pode ter ocorrido devido ao fato das MNPs não tratadas podem apresentar uma distribuição dimensional não controlada, ou seja, podem existir agregados de MNPs que formam estruturas de diversos tamanhos, desde micrometros até poucos nanometros. Como mencionado no item “Biodistribuição” deste apêndice, foram observadas dificuldades respiratórias nos animais que receberam as MNPs não tratadas, além de altos índices de retenção de MNPs nos pulmões. Na maioria dos animais que vieram a óbito, o motivo do óbito foi principalmente por parada respiratória, corroborando a hipótese de que a falta de tratamento das MNPs é prejudicial principalmente à esse órgão.