



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PELO ENCÉFALO DE RATOS, PELO SISTEMA BAC

GUSTAVO MORLIN MORETTO

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

Orientador: *José Ricardo de Arruda Miranda*

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PELO ENCÉFALO DE
RATOS, PELO SISTEMA BAC

GUSTAVO MORLIN MORETTO

ORIENTADOR: JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

CO-ORIENTADOR: CAIO CÉSAR QUINI

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

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Moretto, Gustavo Morlin.

Avaliação e caracterização da biodistribuição de nanopartículas magnéticas pelo encéfalo de ratos, pelo sistema BAC / Gustavo Morlin Moretto. - Botucatu, 2017

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

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: Caio César Quini

Capes: 20900007

1. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 2. Nanopartículas. 3. Encéfalo. 4. Manitol.

Palavras-chave: BAC; encéfalo; manitol; nanopartículas magnéticas.

Dedico este trabalho ao meu primo Matheus e ao meu querido nono Averardo, que durante minha trajetória no Mestrado, viraram duas estrelas que hoje me acompanham do céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por tudo que sempre me proporcionou e por nunca ter me deixado faltar fé nos momentos que mais precisei.

Agradeço aos meus pais, Jair e Ione, e ao meu irmão Augusto, por construírem os pilares que me sustentaram e me sustentam na caminhada que trilho.

Agradeço à minha namorada Beatriz, por todos os momentos de companheirismo, confiança e amor e por me dar a certeza de que nunca estarei sozinho.

Agradeço à todos os meus familiares, que desse ou de outro plano espiritual, sempre me deram apoio e sempre torceram pelo meu melhor.

Aos professores da EEB Prof^a Luiza Santin, do Colégio Dinâmico, do Colégio Energia e da UNESP/Botucatu, por nunca desistirem de mostrar ao mundo o quanto vocês são importantes para que se construa uma sociedade mais justa e honesta.

Aos grandes irmãos que fizeram e fazem parte da República Bagudos, por todos os ensinamentos, conversas jogadas fora e tempo estudado ou perdido que lá passei. Assim como aos meus amigos de Chapecó, que mesmo com a distância e o tempo, não deixaram nossa amizade acabar.

Ao meu orientador, professor Dr. José Ricardo de Arruda Miranda, por sempre ter me instruído e aberto diversas portas desde minha iniciação científica, pelo exemplo de profissional que é e por sempre acreditar que com a ciência se pode ir além. Assim como agradeço à sua esposa, professora Dra. Diana Rodrigues de Pina Miranda, por compartilhar destas mesmas virtudes.

Ao meu co-orientador Dr. Caio César Quini pela amizade e ajuda constante no andamento deste projeto.

A todos os integrantes dos laboratórios Biomag e Lafar, por fazerem parte de uma das muitas famílias que tive em Botucatu.

Agradeço, em especial, a André Gonçalves Próspero e Guilherme Soares por auxiliarem sem hesitar em diversos momentos deste projeto.

Ao laboratório do professor Dr. Marcos Fontes e aos seus integrantes, por permitirem que usássemos os seus equipamentos quando necessário.

Agradeço, por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse meu trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	17
3. METODOLOGIA.....	17
3.1 BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA.....	17
3.2 MANITOL.....	19
3.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	19
3.4 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	19
3.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DOS DADOS	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Resultados Grupos 1, 2 e 3.....	23
4.2 Resultados Grupo 4.....	28
4.3 Resultados Grupo 5.....	30
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

TABELA DE FIGURAS

FIGURA 1: PASTILHA DE GLIADEL, UTILIZADA PARA TRATAMENTO DE TUMORES CEREBRAIS (FIGURA RETIRADA DE: WWW.GLIADEL.COM/HCP/STORAGE).	14
FIGURA 2: ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DO SISTEMA BAC - ILUSTRAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO MONOSENSOR.....	18
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA METODOLOGIA EMPREGADA NO ESTUDO DE CONCENTRAÇÕES DE NPMS EM CADA REGIÃO DO CÉREBRO VIA ESPECTROSCOPIA POR BAC.21	
FIGURA 4: EXEMPLO DE SINAL ADQUIRIDO DA PASSAGEM DAS NPMS PELO CÉREBRO DOS ANIMAIS.....	22
FIGURA 5: COMPARAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA DE SINAL DAS NPMS NOS TRÊS GRUPOS DE ANIMAIS (LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, COM $P<0,05$).	24
FIGURA 6: BIODISTRIBUIÇÃO NO SANGUE PARA OS TRÊS GRUPOS (LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, COM $P<0,05$).	25
FIGURA 7: BIODISTRIBUIÇÃO NOS ÓRGÃOS DE INTERESSE PARA OS TRÊS GRUPOS (LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, COM $P<0,05$).	26
FIGURA 8: BIODISTRIBUIÇÃO NO ENCÉFALO PARA OS TRÊS GRUPOS (LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, COM $P<0,05$).	27
FIGURA 9: TEMPO DE CIRCULAÇÃO DAS NPMS NO ENCÉFALO (LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, COM $P<0,05$).	28
FIGURA 10: BIODISTRIBUIÇÃO NOS ÓRGÃOS DE INTERESSE PARA OS GRUPOS 4.1 E 4.2.	28
FIGURA 11: TEMPO DE MEIA-VIDA NO ENCÉFALO PARA OS GRUPOS 4.1 E 4.2.....	30
Figura 12: Biodistribuição nos órgãos de interesse para os grupos 5.1 e 5.2 (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p<0,05$). 31	

RESUMO

A barreira hematoencefálica é o principal obstáculo para que drogas possam chegar até o cérebro e realizar o tratamento de neuropatologias. Além disso, as doenças ligadas ao Sistema Nervoso Central (SNC) são a segunda categoria de doenças potencialmente fatais, ficando atrás apenas de problemas ligados ao sistema cardiovascular. Devido à baixa eficácia que os tratamentos comuns apresentam, o uso de nanomateriais para o tratamento e diagnóstico deste tipo de patologia tem ganhado grande interesse da área acadêmica.

Este estudo buscou elucidar parâmetros relacionados à nanopartículas magnéticas (NPMs) no cérebro, assim como os efeitos do manitol – fármaco conhecido por sua ação diurética e grande uso no tratamento de anormalidades na pressão intracraniana - em parâmetros como o tempo de meia-vida das NPMs ($T_{1/2}$), acúmulo em diferentes órgãos, intensidade máxima de sinal, entre outros. Foram utilizados três grupos de animais que receberam NPMs, sendo que em dois deles a administração das NPMs ocorreu 15 minutos e 30 minutos após a administração do manitol.

Os resultados apresentaram diferentes intensidades máximas para cada grupo, assim como um diferente acúmulo de NPMs no baço e no sangue para animais que receberam manitol, indicando alterações causadas por este fármaco em sistemas biológicos.

O sistema BAC se mostrou eficaz na detecção de NPMs no cérebro, assim como na posterior análise da biodistribuição destas em organismos vivos. Além disso, os resultados de biodistribuição e tempo de circulação encontrados permitirão estabelecer novas aplicações deste protocolo para implementação de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste e carreadores de fármacos no SNC.

Este estudo buscou aumentar a possibilidade da aplicação do sistema BAC na caracterização e avaliação de parâmetros farmacocinéticos de NPMs em sistemas biológicos.

ABSTRACT

The blood-brain barrier is the main obstacle for drugs to reach the brain and treat neuropathologies. In addition, diseases linked to the Central Nervous System (CNS) are the second category of potentially fatal diseases, behind only problems related to the cardiovascular system. Due to the low effectiveness that common treatments present, the use of nanomaterials for the treatment and diagnosis of this type of pathology has gained great interest in the academic area.

This study sought to elucidate parameters related to magnetic nanoparticles (NPMs) in the brain, as well as the effects of mannitol - drug known for its diuretic action and great use in the treatment of abnormalities in intracranial pressure - in parameters such as the half-life time of NPMs ($T_{1/2}$), accumulation in different organs, maximum signal intensity, among others. Three groups of animals that received NPMs were used, and in two of them the administration of the NPMs occurred 15 minutes and 30 minutes after the administration of mannitol.

The results presented different maximum intensities for each group, as well as a different accumulation of NPMs in the spleen and blood for animals that received mannitol, indicating changes caused by this drug in biological systems.

The BAC system proved to be effective in the detection of NPMs in the brain, as well as in the subsequent analysis of the biodistribution of these into living organism. In addition, the results of biodistribution and time of circulation found will allow to establish new applications of this protocol for the implementation of magnetic nanoparticles as contrast agents and carriers of drugs in the CNS.

This study aimed to increase the possibility of applying the BAC system in the characterization and evaluation of pharmacokinetic parameters of NPMs in biological systems.

Key words: **AC biosusceptometer, magnetic nanoparticles, encephalon**

1. INTRODUÇÃO

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é um método biomagnético amplamente utilizado no estudo do trato gastrointestinal, com os primeiros trabalhos datados de meados de 1950 (1, 2). O método se baseia no uso de dois pares de bobinas idênticos que consistem no sistema de medição e de referência, estando as bobinas mais internas, responsáveis pela detecção, em configuração gradiométrica de primeira ordem a fim de minimizar ou até mesmo cancelar o ruído ambiental. Desta maneira, ao aproximarmos um material de alta susceptibilidade magnética do sensor, ocorrerá um desbalanceamento no fluxo magnético total do sistema, gerando uma força eletromotriz na saída do sistema, que pode ser medida, digitalizada e quantificada, analisada e relacionada com funções fisiológicas do órgão ou tecido alvo do estudo. Cabe ressaltar, que as principais vantagens da BAC são a ausência de radiação ionizante, baixo custo, versatilidade e ser minimamente invasiva.

Inicialmente utilizada no estudo de parâmetros do trato gastrointestinal (TGI) (1) de humanos, como o trânsito orocecal (TTOC) e o esvaziamento gástrico (EG) (3, 4), o sistema BAC foi amplamente aprimorado nas últimas décadas, passando por significativas melhoras técnicas, ocasionadas principalmente pelo aprimoramento eletrônico e experimental, gerando melhoras na relação sinal/ruído e, conseqüentemente, na qualidade dos dados obtidos (5). Além destas aplicações, a BAC também foi empregada no estudo da motilidade gástrica em cães (6) e ratos (7), no esvaziamento gástrico de ratos (8) e em farmacotécnica para estudos tanto *in vitro* quanto em estudos envolvendo humanos (9, 10).

Os materiais magnéticos detectados pelo sistema BAC podem ser divididos em marcadores magnéticos – partículas sólidas contidas em formas farmacêuticas sólidas – e traçadores magnéticos – partículas magnéticas dispersas em determinado meio, grupo no qual estão incluídas as nanopartículas magnéticas (NPMs). O principal traçador magnético utilizado para estudos através do sistema BAC era a ferrita de manganês em pó (material de alta susceptibilidade magnética), que apresenta bons resultados quando aplicada em estudos envolvendo o trato gastrointestinal, e devido ao elevado tamanho de suas partículas (50 a 100 micrometros) não é absorvida pelo organismo, sendo excretada via fezes. Apesar de essas características serem interessantes para o estudo de parâmetros relacionados ao trato gastrointestinal, as

características dimensionais desses materiais limitavam as aplicações da técnica. Devido a estes fatores, foi proposta a utilização de nanopartículas magnéticas (NPMs) como material traçador, o que possibilitou o mapeamento e o monitoramento deste material em órgãos, tecidos e sistemas. Utilizando as NPMs foi possível a realização de estudos envolvendo o trânsito e esvaziamento gástrico de líquidos (8) e a avaliação de perfusão renal em ratos (11).

Nanopartículas magnéticas e ferrofluidos são materiais com grande versatilidade (12). Além da grande capacidade de penetração que estes nanomateriais possuem, existe a possibilidade de revesti-los com diferentes materiais, o que permite uma nova abordagem, mais ampla e aprofundada de questões fisiológicas e morfológicas ainda pouco elucidadas. Modificando quimicamente o revestimento de partículas magnéticas, é possível realizar a marcação de células e tecidos específicos (13). Devido a estas características, este tipo de material vem sendo amplamente utilizado para a entrega de fármacos (14), em procedimentos quimioterápicos (15) e de hipertermia magnética (16), onde nanopartículas são guiadas até tecidos específicos e através de aplicação de um campo magnético de alta frequência são aquecidas, o que leva desde o aumento da resposta imunológica local até a morte do tecido tumoral (17-20).

Os principais parâmetros responsáveis pelo destino das NPMs dentro de organismos vivos são o potencial Zeta (afinidade eletrônica), o tamanho, o revestimento e o seu núcleo. O potencial Zeta e o diâmetro das partículas são alguns dos principais fatores que influenciam no destino destas NPMs em organismos vivos (21, 22). A fim de alterar o destino final das NPMs no organismo, é possível utilizar estratégias que se baseiam em diferentes tipos de revestimentos biocompatíveis. Desta maneira, é possível alterar o potencial Zeta, diâmetro e conseqüentemente a afinidade das partículas com certos órgãos e sistemas de interesse. Estes revestimentos, além de alterarem o potencial Zeta das NPMs de maneira mais adequada ao seu objetivo de uso, podem também serem associados com agentes de *targeting* que interagem com receptores no sistema biológico e permitem uma melhor funcionalidade das NPMs. Por exemplo, partículas revestidas com albumina do soro bovino apresentam maior possibilidade de penetrarem no cérebro do que as mesmas partículas revestidas com outros tipos de revestimento, seja eles protéicos ou não, pois a albumina é uma proteína que possui receptores próprios em tal órgão (23).

Desta forma, nanopartículas podem ser utilizadas em diversas aplicações, desde o tratamento de doenças (24) até como contraste em ressonância magnética (25). Devido às características intrínsecas destes materiais, como suas dimensões e as inúmeras possibilidades de revestimento, esses materiais têm sido propostos como agentes carreadores de fármacos, já que são capazes de acessar locais e órgãos pouco acessíveis (26). Recentemente, uma das aplicações destes materiais que mais tem tido atenção da comunidade científica é a entrega guiada de fármacos no Sistema Nervoso Central (SNC) (27).

As doenças que afetam o SNC (como a doença de Alzheimer, o acidente vascular, os cânceres cerebrais, etc) são a segunda categoria de doenças potencialmente fatais (28). Apesar da grande quantidade trabalhos na área, o desenvolvimento de novas terapias e diagnósticos para estes tipos de doenças ainda é relativamente pequeno (29).

Um grande obstáculo enfrentado na entrega de fármacos no tecido cerebral é presença da barreira hematoencefálica (BHE) (27). Esta barreira envolve os vasos sanguíneos do Sistema Nervoso Central (SNC) e tem papel importante para o funcionamento normal do cérebro. Seu principal papel é impedir a passagem de toxinas para o cérebro, assim como manter a concentração ideal de componentes como água e dopamina no cérebro (30). Após alimentação ou atividades físicas as concentrações extracelulares sofrem diversas mudanças em relação aos níveis de potássio, aminoácidos e hormônios. Este tipo de alteração não pode ocorrer abruptamente no cérebro, pois como regulam funções neuronais. Sendo assim, tais oscilações podem gerar uma atividade cerebral desregulada. Para que isto não ocorra, as células endoteliais, presentes no SNC e que compõe a BHE, são altamente seletivas e especializadas para terem total controle sob o que entra ou sai do SNC (31).

Desta forma, a BHE é formada por um complexo sistema celular que difere de barreiras celulares presentes em outros órgãos por dois motivos: i) pelo fato de as junções ocludentes serem presentes entre as células endoteliais do cérebro – o que impede o transporte paracelular – e ii) pelo fato de não existirem vias transendoteliais. Apesar disso, a água move-se livremente no cérebro devido à osmolaridade, assim como o dióxido de carbono, o oxigênio e anestésicos voláteis, que se difundem rapidamente no cérebro (32). Já o transporte de glicose ocorre através da Proteína de

Transporte de Glicose (GLUT-1), sendo muito encontrada nas células endoteliais dos capilares cerebrais. Cabe ressaltar que os órgãos circumventriculares, compostos pela glândula pineal, órgão subfornical, órgão vascular da lâmina terminal, eminência média, órgão subcomissural, neurohipófise e área poetrema, não são envoltos pela barreira hematoencefálica (33), se apresentando também como uma possível via de entrada de substâncias no tecido cerebral. Os principais fatores que influenciam na passagem de substâncias, como fármacos, agentes de contraste e nanopartículas, são o seu tamanho, sua solubilidade lipídica e sua hidrofiliabilidade (28).

Apesar da BHE ser extremamente importante para uma atividade cerebral normal, ela impede que muitos fármacos possam chegar até o cérebro, dificultando o tratamento de diversas doenças (34). Desta forma, é necessário que sejam desenvolvidas estruturas capazes de penetrar tal barreira, possibilitando novas alternativas de tratamento e também de diagnóstico. Sendo assim, é inevitável a busca de novas soluções que permitam um tratamento mais adequado de doenças neurológicas, como doença de Parkison, deficiência de GLUT-1 e principalmente glioblastomas.

Glioblastoma é o mais comum e mais agressivo câncer cerebral primário (35). A sobrevida após o diagnóstico inicial é, em média, de apenas 2 anos (36). Estudos que mesclam técnicas como radioterapia e perfusão cerebral de fármacos como o Gliadel® e o Paclitaxel® (35) têm atingidos bons resultados no aumento da taxa de sobrevida para pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor. O primeiro é aplicado após a retirada de tumores cerebrais. Após a retirada do tumor, o local onde este se encontrava, é preenchido por pastilhas de Gliadel, como as mostradas na figura 1.



Figura 1: pastilha de Gliadel, utilizada para tratamento de tumores cerebrais (figura retirada de: www.gliadel.com/hcp/storage).

Estas pastilhas contêm nanopartículas, que por sua vez contêm carmustina. A carmustina é um composto químico com grande atuação no tratamento de tumores cerebrais (36). Ao serem degradadas, as pastilhas vão liberando as nanopartículas com carmustina, diminuindo e até mesmo impedindo que o tumor volte a aparecer (36).

O segundo fármaco é administrado na forma de nanopartículas revestidas com albumina. Estas nanopartículas utilizam o canal GP-60 dos tumores, que é responsável pela passagem de albumina para dentro das células tumorais. Ao adentrar nestas células, o Paclitaxel® age, causando a morte celular (37).

Alternativas menos invasivas e que alcancem melhores resultados de tratamento, não só na sobrevida, mas também na qualidade de vida dos pacientes são extremamente necessárias (37). O aumento de estudos e combinações de técnicas, como a modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica e a administração e monitoramento de nanopartículas, são fundamentais para este objetivo ser atingido (35).

A modulação da permeabilidade da BHE pode ser alcançada utilizando-se disruptores hiperosmóticos como o manitol (38). O manitol é um poliol, de fórmula química $C_6H_{14}O_6$ e massa molar 182,17 g/mol. É utilizado na indústria farmacêutica, devido à sua função osmótica, e em neurocirurgias, pois diminui a pressão intracraniana, diminui a massa cerebral e pode tratar edemas. No caso de pessoas que apresentam elevada pressão intracraniana, o manitol age por duas vias: através de um efeito imediato, onde há expansão do plasma; e um efeito retardado, relacionado à sua ação osmótica. O primeiro efeito reduz a viscosidade do sangue, aumentando o fluxo microvascular cerebral e a oxigenação deste, além de aumentar o volume intravascular e o *output* cardíaco. Juntos, esses dois efeitos resultam no aumento do fluxo sanguíneo cerebral e em uma vasoconstrição cerebral compensatória, nas regiões onde a pressão intracraniana está normal. O manitol também gera um gradiente osmótico entre o plasma e as células do cérebro, retirando água do espaço extracelular para os vasos sanguíneos, estratégia que é utilizada para reduzir edemas cerebrais. Um requisito importante para a ação osmótica do manitol é uma BHE intacta (39, 40). Em humanos, a dose adequada de manitol é de 0,25 a 1 g/kg e o pico do efeito ocorre cerca de 30 minutos após a administração e dura cerca de 6 horas.

Além disso, problemas neurológicos como pressão intracraniana, são tratados com o uso de manitol, sendo este um fármaco que altera a osmolaridade do corpo humano, e conseqüentemente alivia a pressão intracraniana (41). O manitol é capaz de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que ajuda na entrega de substâncias no cérebro (38), e também é capaz de aumentar a passagem de nanopartículas, facilitando novas estratégias de entrega de fármacos neste local (42). Apesar de utilizarem NPMs com diâmetros relativamente grandes (em torno de 50 nm), Kim et. al., (2006) conseguiram concentrações significativas de NPMs no tecido cerebral associando as NPMs com a administração prévia de manitol. Devido às características já citadas das NPMs, como tamanho reduzido e a possibilidade de inúmeros tipos de revestimento, o que por sua vez permite o elevado controle da lipossolubilidade e hidrofiliçidade destes materiais, estes materiais por si só já possuem grande potencial de diagnósticos e terapias cerebrais (43). Portanto, o uso de manitol associado com nanopartículas pode ser um método extremamente valioso na entrega de fármacos no tecido cerebral, aumentando a eficácia na entrega guiada de fármacos neste local. Vale ressaltar ainda que existem estudos que relatam acúmulos de nanopartículas no cérebro de ratos, em condições fisiológicas normais, através de mecanismos ainda não esclarecidos (42).

A partir da proposição do uso de NPMs como agentes carreadores de entrega de fármacos no tecido cerebral, são necessárias instrumentações e metodologias capazes de avaliar e quantificar a chegada e acúmulo destes materiais nanoestruturados no cérebro. As técnicas mais utilizadas para estudar o acúmulo de NPMs em órgãos e sistemas são realizadas *ex vivo*, o que necessita de amostras, retiradas através de biopsias, ou até mesmo da eutanásia para a coleta de órgãos (quando estes estudos são realizados em animais). As principais técnicas utilizadas nesse segmento (análises *ex vivo*) são a ressonância magnética eletrônica (44, 45) e a relaxometria (46, 47).

Atualmente, existem algumas técnicas que são capazes de detectar as NPMs *in vivo*, porém em sua maioria não são capazes de interagir com esses materiais dentro de organismos biológicos através das suas propriedades magnéticas, fazendo o uso, então, de marcadores radioativos (48) ou agentes fluorescentes. Essa marcação das NPMs por outros tipos de agentes detectáveis (radioativos ou fluorescentes)

apresentam uma grande desvantagem, pois se por algum motivo a marcação das NPMs se desfizer, será detectado o material marcador e não as NPMs.

Técnicas como o imageamento por ressonância magnética (MRI – do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) (49) e o imageamento de partículas magnéticas (MPI – do inglês *Magnetic Particles Imaging*) (50) vêm recebendo grande atenção da comunidade científica nos últimos anos, pois são capazes de detectar as NPMs *in vivo* devido às suas propriedades magnéticas intrínsecas. As técnicas de MRI e MPI permitem um amplo estudo de nanopartículas em sistemas biológicos, porém enfrentam problemas por se mostrarem extremamente complexas, de difícil manuseio, baixa resolução temporal, alto custo e necessitarem de ambiente controlado, o que dificulta a associação com outras técnicas, inclusive terapêuticas, como por exemplo, a hipertermia magnética. Vale ressaltar também que devido aos seus altos custos, essas técnicas são pouco acessíveis quando específicas para experimentação animal. Ainda que a técnica de MRI seja considerada uma técnica padrão, existe uma lacuna na literatura da detecção de NPMs de ferrita de manganês por este método, já que esses materiais têm alta susceptibilidade magnética, o que gera, com frequência, artefatos na imagem adquirida. Neste sentido, são necessárias novas técnicas capazes de detectar e monitorar esses materiais nanoestruturados no cérebro *in vivo* e em tempo real, a fim de estudar e quantificar a chegada e acúmulo desses materiais no cérebro, definindo, então, doses de NPMs necessárias para a eficácia na entrega de fármacos no tecido cerebral e janelas temporais de possíveis diagnósticos e tratamentos (51), como no caso de hipertermia magnética no tratamento de gliomas.

Em 2008, Sanhai et al. propuseram sete desafios para a nanomedicina. Destes desafios, dois dizem respeito à parte experimental e clínica de nanomateriais e nanopartículas em sistemas biológicos. O primeiro, diz respeito à detecção em tempo real destes materiais no organismo e o segundo, a necessidade de saber onde e qual a quantidade de material acumulada em cada órgão ou tecido. A técnica BAC, apresentada anteriormente e também objeto deste estudo, é capaz de superar estes dois desafios, pois detecta o sinal dinâmico das NPMs em sistemas biológicos e permite fazer a avaliação da biodistribuição de NPMs nos órgãos de interesse. Portanto, a técnica BAC mostra-se extremamente interessante para o estudo do comportamento de NPMs em sistemas biológicos, assim como poderá auxiliar na

elucidação de diversos parâmetros relacionados à NPMs e sua interação com o encéfalo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomagnetismo - Departamento de Física e Biofísica - Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP Botucatu. Em termos gerais, foi utilizado o sistema de Biosusceptometria AC para mapeamento e monitoramento de nanopartículas magnéticas no cérebro de ratos em duas situações: animais controle e animais que receberam uma dose prévia do fármaco manitol. Os objetivos específicos foram:

- Avaliação do tempo de circulação de nanopartículas magnéticas revestidas com citrato e de revestidas com albumina no cérebro dos animais;
- Avaliação do tempo de circulação, das NPMs revestidas com citrato, no cérebro de animais que receberam uma administração prévia de manitol em diferentes tempos (15 ou 30 minutos antes de receberem a dose de nanopartículas);
- Análise da biodistribuição de nanopartículas magnéticas no cérebro de ratos, assim como no fígado, baço, pulmão, rins, coração e sangue;
- Análise do acúmulo, das NPMs revestidas com citrato assim como as revestidas com albumina, no cérebro de animais que receberam uma administração prévia de manitol em diferentes tempos (15 ou 30 minutos antes de receberem a dose de nanopartículas);
- Análise do tempo de circulação, das NPMs revestidas com citrato (lote diferente do usado nos tópicos anteriores), no coração e no cérebro, após 30 minutos da administração do manitol.

3. METODOLOGIA

3.1 BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA

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 (figura 1A). Quando não há material magnético próximo ao sistema de medida, a resposta é minimizada. Ao aproximar o material magnético do par de bobinas, 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. 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.

Neste trabalho, foi utilizado um sistema BAC mono-sensor de 2,8 cm de diâmetro que apresentou uma resolução espacial de 1,70 cm, aferido via meia largura da banda (FWHM – do inglês *Full width at half maximum*).



Figura 2: Esquema de funcionamento do sistema BAC - ilustração do funcionamento do monossensor.

3.2 MANITOL

A solução de manitol utilizada na realização deste experimento contém 200 mg de manitol dissolvidas em 1 mL de água para injeção q.s.p. Cada animal recebeu, via endovenosa, uma dose de manitol de 4 mg/kg de animal [42] em diferentes tempos pré-administração das nanopartículas, conforme seu grupo experimental (ver seção 3.4).

3.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$), com tamanho médio de 17 nm, dispersas em solução de pH 7,4, com magnetização de saturação de 41,6 emu/g. Uma das amostras de NPMs possuía revestimento de citrato (Ci-NPMs) e a outra de albumina de soro bovino (BSA-NPMs) e foram sintetizadas e caracterizadas pelo Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica e Nanomagnetismo, sob supervisão do Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakusis, Departamento de Física – Universidade Federal de Goiás.

3.4 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Para a realização deste experimento foram utilizados 25 ratos adultos (*Rattus norvegicus albinus* – linhagem Wistar), machos, com peso entre 250 e 350 gramas e cerca de 90 dias, provenientes do Biotério Central – UNESP Botucatu, mantidos em condições e local adequado.

Os animais foram anestesiados com uretano (99% - 1,5 mg/kg) e submetidos à cirurgia de canulação de veia femoral para a administração endovenosa das NPMs. A cânula utilizada possuía 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 femoral para em seguida a cânula ser inserida na veia femoral do animal. Após esse procedimento, a cânula permaneceu ocluída até o momento das administrações endovenosas de NPMs. Os animais do grupo 1, grupo 2, grupo 3 e grupo 4 foram, então, posicionados em decúbito ventral e o sensor do sistema BAC, posicionado sobre a cabeça do animal, a fim de detectar a passagem das NPMs no cérebro. Para o grupo 5, os animais foram posicionados em decúbito ventral e o sensor do sistema BAC foi posicionado sobre o coração do animal.

Os animais receberam uma dose de solução contendo NPMs de ferrita de manganês [23 mg/mL], numa taxa de administração de 0,03 mL/s, conforme as características de seu grupo experimental:

- Grupo 1: cinco animais que receberam uma dose de 0,5mL de solução, contendo NPMs revestidas com citrato, sem administração prévia de manitol;
- Grupo 2: cinco animais que receberam uma dose de 0,5mL de solução contendo NPMs revestidas com citrato, 15 minutos após a administração de manitol;
- Grupo 3: cinco animais que receberam uma dose de 0,5mL de solução contendo NPMs revestidas com citrato, 30 minutos após a administração de manitol;
- Grupo 4: 10 animais que receberam uma dose de 0,5 mL de solução contendo NPMs revestidas com citrato, 30 minutos após a administração de manitol. Em 5 animais o sensor foi posicionado sobre o cérebro (Grupo 4.1) e em outros 5 o sensor foi posicionado sobre o coração (Grupo 4.2).
- Grupo 5: 10 animais, sendo: 5 animais que receberam 0,3 mL de NPMs revestidas com citrato (Grupo 5.1) e 5 animais que receberam NPMs revestidas com albumina (Grupo 5.2).

Vale ressaltar que nos grupos 1, 2, 3 e 5 o sensor do sistema BAC foi posicionado sobre a cabeça do animal, enquanto que no subgrupo 4.2 o sensor foi posicionado sobre o coração dos animais. O grupo 4, referente aos subgrupos 4.1 e 4.2, foi criado após a coleta dos dados dos outros grupos e tem a finalidade de investigar se o manitol causa um aumento no tempo de circulação das partículas apenas no cérebro do animal, ou na corrente sanguínea como um todo, e conseqüentemente também no cérebro.

Após a administração e aquisição dos dados, os animais, ainda anestesiados, foram eutanasiados por método de decaptação (após aproximadamente uma hora a partir do início da administração) para coleta do cérebro, sangue e órgãos de interesse – fígado, baço, pulmão, rim, coração. Foi realizado um procedimento experimental onde todas as partes do cérebro passaram por processo de liofilização e homogeneização a fim de realizar um estudo de biodistribuição cerebral via espectroscopia por BAC.

3.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DOS DADOS

A análise dinâmica dos dados foi realizada por Lock-in (Stanford Research System®) e sistema Biopac® (Amplificador Biopac Systems modelos MP150), na frequência de aquisição de 20 Hz. O parâmetro dinâmico relacionado ao tempo de circulação das NPMs no cérebro de cada animal foi quantificado por meio de: 1) 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) variação de intensidade máxima do sinal (ΔI_{max}) e 3) intensidade final do sinal (I_f). O tempo de chegada das NPMs no cérebro (TC) também foi avaliado, sendo calculado a partir do instante da administração até o valor máximo de sinal adquirido.

O $T_{1/2}$ foi calculado através de *fit* exponencial do sinal, através do *software* OriginPro 8.5®.

A espectroscopia por BAC foi feita em cada uma das amostras, com peso e volume padronizado, onde foi aferida a concentração de NPMs por grama de tecido seco. A espectroscopia foi realizada posicionando um *ependorf* com a amostra na superfície de detecção do sensor e registrando o sinal referente à quantidade de material magnético em cada amostra, como mostra a figura 2. Esse estudo, ainda não finalizado, permitirá determinar exatamente o número de NPMs por amostra, disponibilizando informações do número de NPMs acumulada por grama de tecido do cérebro. Para comparação dos dados de espectroscopia por BAC, foi usado o teste *Anova two-way*.

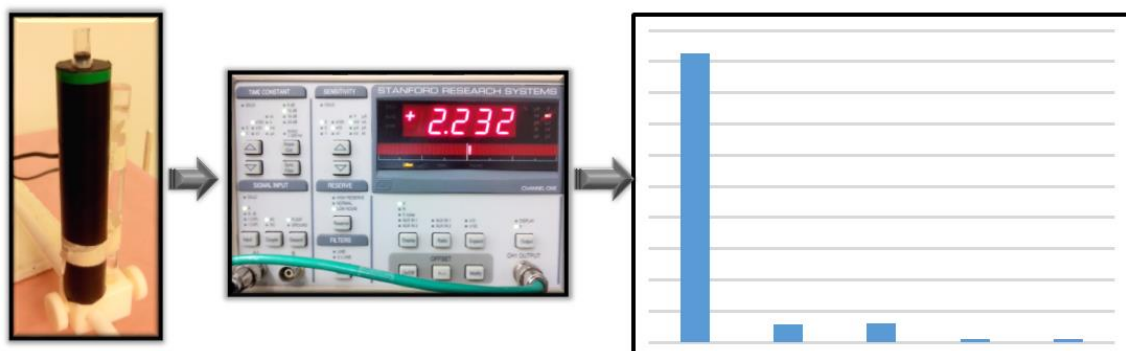


Figura 3: Representação ilustrativa da metodologia empregada no estudo de concentrações de NPMs em cada região do cérebro via espectroscopia por BAC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos três grupos, o perfil morfológico do sinal de passagem das NPMs pelo cérebro foi igual, apresentando um pico de chegada e um decaimento exponencial (figura 4).

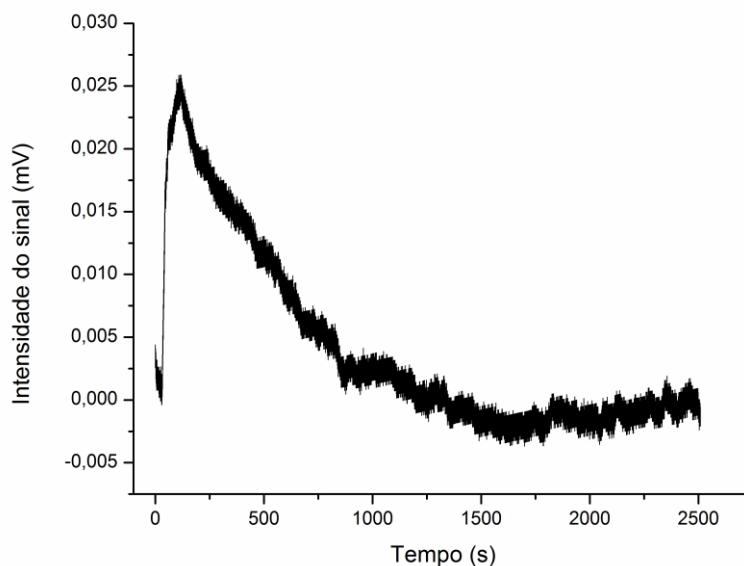


Figura 4: Exemplo de sinal adquirido da passagem das NPMs pelo cérebro dos animais.

Considerando todos os animais e analisando o tempo de chegada das NPMs ao cérebro, podemos analisar em quanto tempo temos a intensidade máxima de sinal destas no cérebro. Esta intensidade representa o momento em que ocorre a maior concentração de NPMs no encéfalo.

Na tabela 1, estão os valores de intensidade máxima de sinal para cada grupo.

Tabela 1: Média da intensidade máxima de sinal das NPMs revestidas com citrato e albumina no encéfalo e no coração

Grupo	Intensidade máxima
Grupo 1	0,026 ± 0,001 mV
Grupo 2	0,026 ± 0,002 mV
Grupo 3	0,016 ± 0,001 mV
Grupo 4.1	0,020 ± 0,002 mV
Grupo 4.2	0,073 ± 0,009 mV
Grupo 5.1	0,020 ± 0,004 mV
Grupo 5.2	0,008 ± 0,001 mV

4.1 Resultados Grupos 1, 2 e 3

Em relação a intensidade máxima (tabela 1), os grupos 1 e 2 não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), porém, em relação ao grupo 3, ambos apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

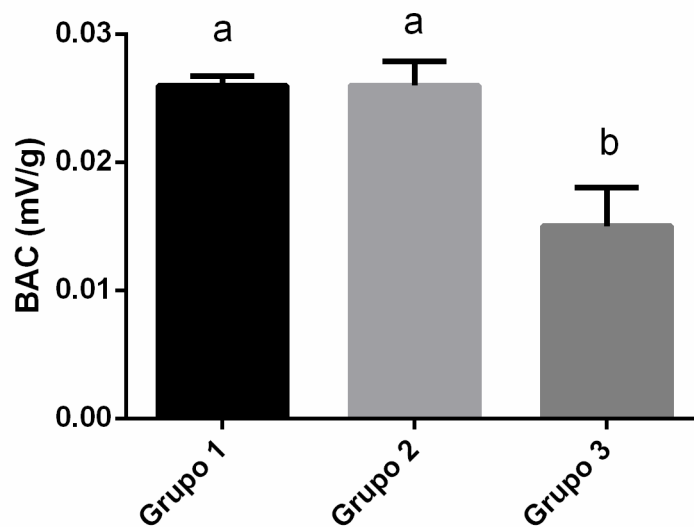


Figura 5: Comparação entre a intensidade máxima de sinal das NPMs nos três grupos de animais (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

Como pode ser observado na figura 6, a menor intensidade de sinal é encontrada no grupo 3. Esse efeito possivelmente ocorre por causa de uma maior retirada de fluídos do encéfalo, devido ao efeito do manitol. O manitol é conhecido por diminuir a pressão intracraniana, através de vasoconstrição e aumento do fluxo sanguíneo no cérebro (40), o que pode indicar essa menor intensidade do sinal para o grupo 3. Além disso, esses dados sugerem que o efeito do manitol é intensificado entre 15 e 30 minutos após a sua administração, uma vez que apenas o grupo 3 apresenta diferença estatística significativa em relação aos outros grupos.

Pode-se notar que a BHE possivelmente teve sua permeabilidade alterada pelo manitol e que este efeito alterou a chegada de NPMs no encéfalo em um primeiro momento. Essa mudança na BHE é importante e deve ser mais aprofundado, para que o uso conjunto de manitol e NPMs possa ser aprimorado e aumente sua gama de aplicações. Por exemplo, se for utilizado NPMs com quimioterápicos associados ou para procedimentos diagnósticos, o manitol pode permitir uma maior chance de sucesso nesses procedimentos. Estudos futuros devem verificar a viabilidade e a aplicabilidade desse conjunto, para que tanto tratamentos quanto diagnósticos sejam cada vez mais eficazes, levando a melhores resultados e também possibilitando procedimentos menos invasivos e mais viáveis, relacionados ao tratamento e diagnóstico de neuropatologias. Exemplos da importância do uso desse conjunto, pode ser visto em Yang et. al. (2011), que com o uso de ressonância magnética, utilizou

manitol e nanopartículas magnéticas para verificar danos causados pela doença de Alzheimer em ratos e em Nair et. al. (2016), que usou o conjunto acima citado para verificar a possibilidade do uso deste no controle da NeuroAIDS.

A análise de biodistribuição dos órgãos retirados após o sacrifício do animal indicou um menor acúmulo de NPMs no sangue quando foram comparados o comportamento do grupo 1 em relação ao grupo 2 e 3 (figura 8).

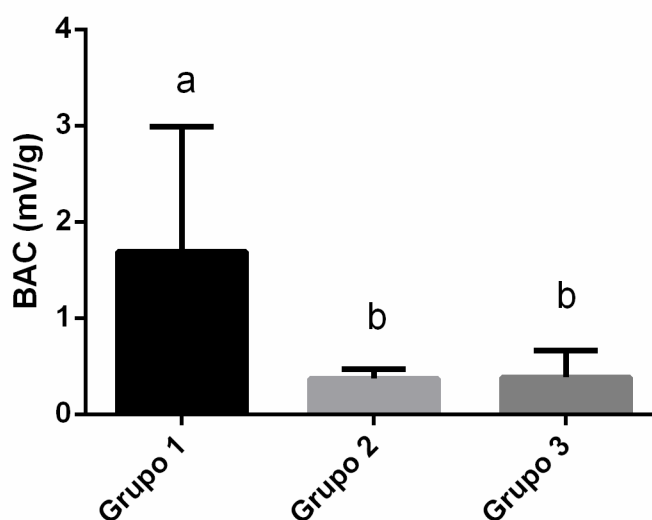


Figura 6: Biodistribuição no sangue para os três grupos (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

Este comportamento pode estar associado com a alteração causada na viscosidade do sangue devido ao efeito do manitol, que se acentua após 15 minutos e atinge o efeito máximo entre de 30 e 45 minutos depois de sua administração (51). Além disso, como mostrado na figura 9 e na figura 10, o manitol alterou somente a biodisponibilidade de NPMs no encéfalo de ratos além do sangue, sendo que após a administração deste fármaco a quantidade de NPMs encontrada em tal órgão foi maior após 15 e 30 minutos de administração quando comparados ao grupo que não recebeu manitol. Portanto, é possível que a menor quantidade de NPMs no sangue após o uso do manitol esteja associada ao maior acúmulo de NPMs no cérebro e com uma possível alteração de osmolaridade no organismo do animal como um todo. Sun et. al. (2014) encontrou resultados semelhantes ao utilizar o manitol em um cultura de células da BHE. Esta hipótese é de extremo interesse para o meio científico, pois reitera a importância que o manitol pode ter para levar em maior quantidade de NPMs usadas no tratamento e diagnóstico de neuropatologias.

Ao garantir uma maior entrega de NPMs ao cérebro, garantimos uma maior eficácia, por exemplo, em tratamentos de tumores por hipertermia.

Como pode ser notado na figura 9, os órgãos com maior contribuição na biodistribuição, são o fígado e o baço. Esta ação está relacionada principalmente com a grande ação macrófaga destes órgãos, pois, os macrófagos, ao reconhecerem as NPMs como um agente patógeno agem rapidamente retirando-as da circulação (52).

Em relação à biodistribuição no encéfalo (figura 10), houve diferença significativa entre o grupo 1 quando comparado ao grupo 2 e ao grupo 3 (grupo 1: 0 mV; grupo 2: $0,037 \pm 0,034$ mV; grupo 3: $0,042 \pm 0,029$ mV), o que indica que além do manitol aumentar o fluxo sanguíneo e criar um gradiente osmótico entre o plasma e as células cerebrais, a permeabilidade das NPMs na BHE pode estar sendo aumentada (42).

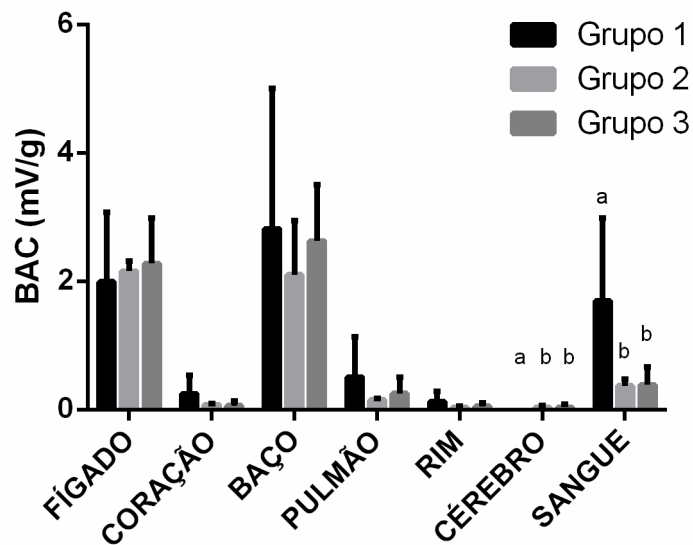


Figura 7: Biodistribuição nos órgãos de interesse para os três grupos (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

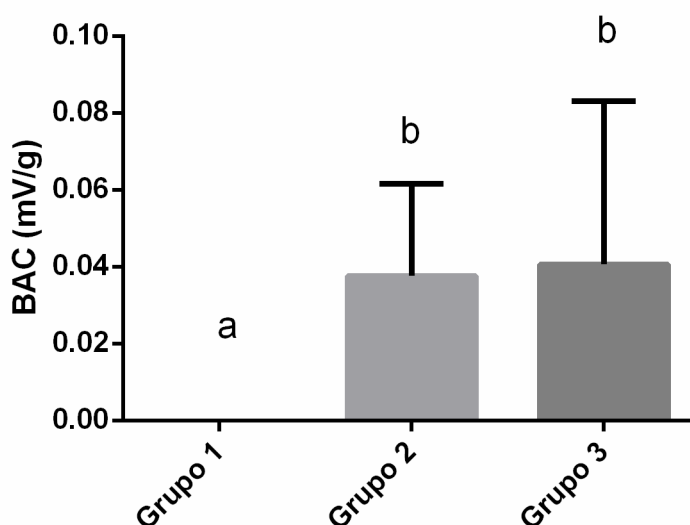


Figura 8: Biodistribuição no encéfalo para os três grupos (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

Em relação ao tempo de chegada das NPMs ao encéfalo, os grupos não apresentaram diferença significativa entre si, como mostrado na figura 11.

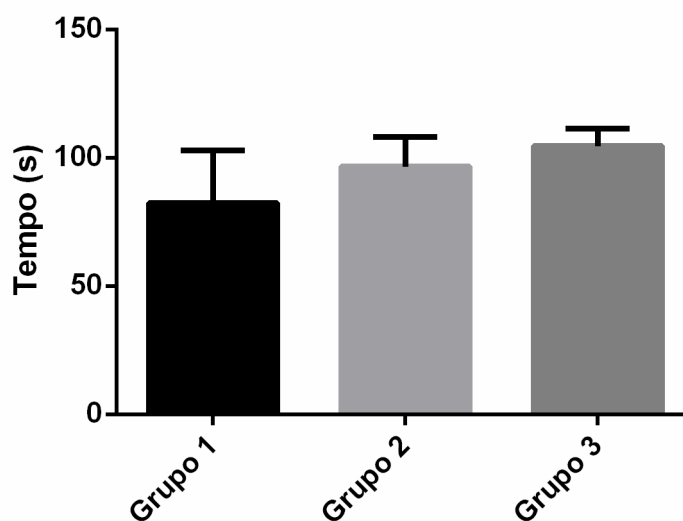


Figura 11: tempo de chegada das NPMs no encéfalo de ratos.

Outro fator importante na análise do papel do manitol na avaliação de NPMs no cérebro é a análise do tempo de circulação destas no cérebro após a administração do fármaco. Este parâmetro apresentou diferença significativa no grupo 3 (figura 12) em relação aos outros dois grupos (grupo 1: $1695,340 \pm 72,726$ segundos; grupo 2: $1182,819 \pm 523,331$ segundos; grupo 3: $2641,871 \pm 485,552$ segundos). Esses dados ressaltam a possibilidade do manitol influenciar a permeabilidade da BHE, assim como

alterar a viscosidade do sangue, alterando conseqüentemente o tempo de circulação das NPMs pelo encéfalo.

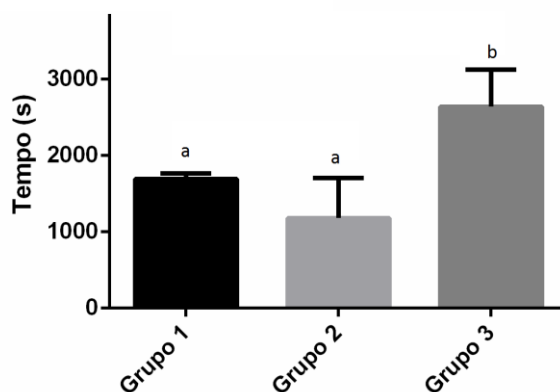


Figura 9: Tempo de circulação das NPMs no encéfalo (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

4.2 Resultados Grupo 4

Em relação ao grupo 4.1 e ao grupo 4.2, ambos não apresentaram diferença significativa em relação à biodistribuição (figura 12), analisando todos os órgãos, o que era esperado, pois ambos os grupos receberam a mesma dose de partículas, do mesmo lote, e foram eutanasiados no mesmo tempo após a administração, sendo que a única diferença entre os grupos foi o posicionamento do sensor do sistema BAC.

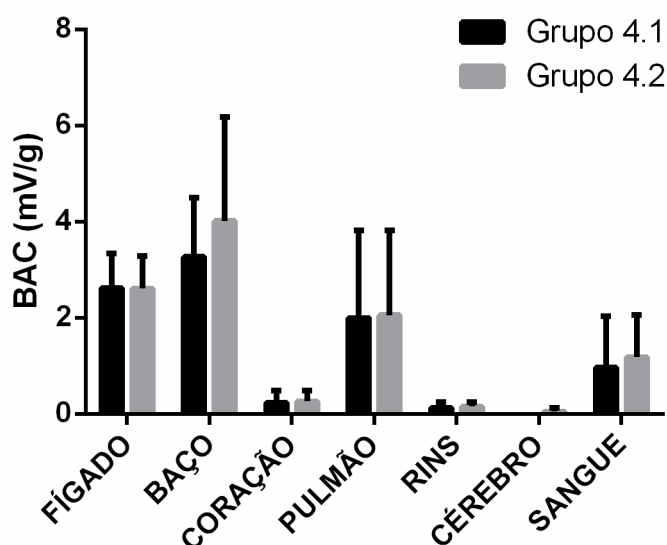


Figura 10: Biodistribuição nos órgãos de interesse para os grupos 4.1 e 4.2.

Quando comparados os dados relativos ao tempo de meia-vida no coração e no encéfalo, após o efeito do manitol, o tempo de meia-vida no coração (grupo 4.2) foi menor que o do cérebro (grupo 4.1 [$p < 0,05$]), como mostrado na figura 13. Estudos anteriores do grupo de pesquisa ao qual este trabalho é vinculado demonstraram um tempo de circulação na corrente sanguínea ($T_{1/2}$) de cerca de 600 segundos no coração (53) , enquanto que neste trabalho encontrou-se um tempo de circulação de $1283,23 \pm 120,21$ na corrente sanguínea. As NPMs utilizadas no trabalho citado possuíam características semelhantes, porém um pouco diferentes das usadas neste trabalho, por exemplo, no trabalho citado as partículas estavam em uma maior concentração [46 mg/ml] e estudos relatam que maiores concentrações apresentam maiores tempos de circulação (54), o que corrobora o fato de que o tempo de circulação das partículas na corrente sanguínea do animal pode estar sendo influenciado pela ação do manitol. Apesar disso, estudos futuros devem ser realizados, com metodologia específica e utilizando o mesmo lote de partículas, a fim de obter-se dados irrefutáveis de que o manitol está, de fato, influenciando o tempo de circulação das partículas na corrente sanguínea, e não somente no cérebro do animal. Entretanto, os dados obtidos neste presente trabalho sugerem que apesar do manitol poder influenciar no tempo de circulação das NPMs na corrente sanguínea, este fármaco apresenta maior influência no tempo de circulação no cérebro do animal, uma vez que o valor de $T_{1/2}$ obtido no cérebro foi maior do que o obtido para a circulação em animais com mesmas características experimentais (dose, lote, peso, idade – apenas a posição do sensor [coração ou cabeça] que foi alterada).

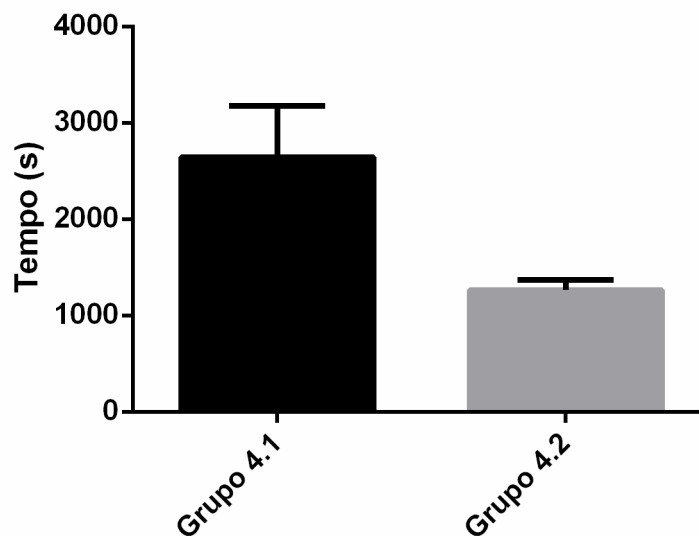


Figura 11: tempo de meia-vida no encéfalo para os grupos 4.1 e 4.2.

4.2 Resultados Grupo 5

Neste grupo, não foi possível avaliar corretamente o comportamento das NPMs revestidas com albumina. Após a aquisição dos dados e posterior avaliação, verificou-se que estas apresentaram um comportamento totalmente atípico. Este comportamento provavelmente está ligado a problemas na síntese destas NPMs revestidas com albumina. O processo de realizar o revestimento destas partículas com albumina do soro bovino é extremamente complexo e muitas vezes a proteína não apresenta forte ligação com a partícula, fazendo com que as partículas estejam ligadas logo após a síntese e desligam-se em um tempo mais dilatado. Desta maneira, os dados apresentados a seguir foram, provavelmente, influenciados por algum processo de degradação da ligação entre a proteína e a partícula, o que está diretamente ligado à estabilidade das partículas no fluido. Após a realização dos experimentos *in vivo*, esse lote de partículas revestidas com albumina passou por processo de nova caracterização e apresentou diâmetros hidrodinâmicos da ordem de 1000 nm, muito diferente da primeira caracterização (logo após a síntese) que era da ordem de 100 nm. Essa alteração de diâmetro hidrodinâmico evidencia o fato de que as partículas perderam sua estabilidade no fluido e formaram agregados, o que só seria possível se existisse a degradação da ligação entre as partículas e a proteína.

Os resultados mostrados na figura 13, relativos à biodistribuição, indicam um comportamento de NPMs sem revestimento. Desta forma, é possível que o revestimento de albumina das NPMs não estava ligado de maneira adequada à superfície das partículas, impedindo uma avaliação mais precisa do comportamento destas no encéfalo de ratos.

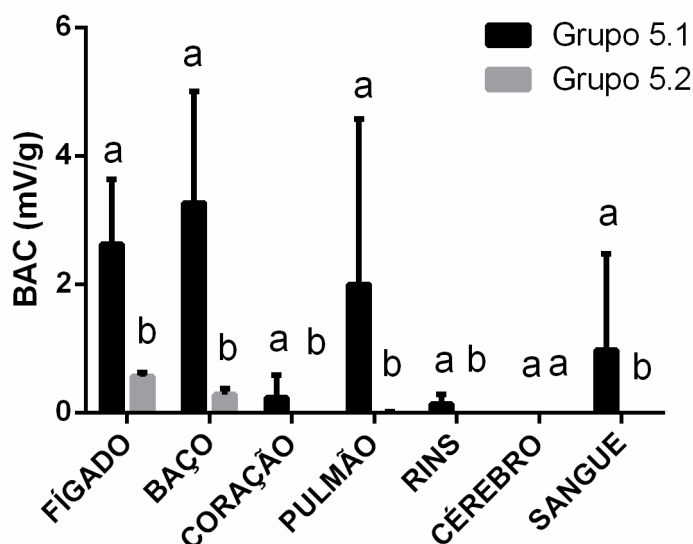


Figura 12: Biodistribuição nos órgãos de interesse para os grupos 5.1 e 5.2 (letras diferentes diferem estatisticamente entre si, com $p < 0,05$).

5 CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a alteração nos perfis de perfusão, tempo de circulação cerebral e acúmulo de nanopartículas no tecido, provocados pela administração do fármaco manitol através do sistema BAC. Em relação aos parâmetros avaliados até o momento, o manitol alterou a biodisponibilidade das NPMs no cérebro de ratos. Estas alterações provavelmente estão ligadas às alterações causadas pelo manitol nos vasos sanguíneos do cérebro, pois ao causar vasoconstrição neste órgão, um processo compensatório de vasodilatação ocorre em sua periferia. Este processo aumenta o fluxo sanguíneo no cérebro e, conseqüentemente, o fluxo de NPMs.

Em relação ao grupo 1, os outros dois grupos apresentaram menor quantidade de NPMs no sangue, o que deve estar ligado à ação do manitol na viscosidade do sangue, que o torna mais aquoso e, portanto, ocorre uma maior diluição das NPMs em seu conteúdo (39).

O tempo de circulação das NPMs também aumentou após a administração do manitol. Este parâmetro provavelmente foi alterado devido ao aumento do *output* cardíaco e a alteração causada pelo manitol na permeabilidade da BHE (55), gerada pelo gradiente osmótico que este fármaco cria entre o plasma e as células cerebrais.

O perfil de maior retenção em órgãos como o fígado e o baço devem-se as suas características morfofisiológicas, sendo possível avaliar a biodistribuição em diferentes órgãos com o sistema BAC.

Negativamente, pode-se ressaltar a impossibilidade de concluir o comportamento das NPMs revestidas com albumina. Espera-se concluir estes estudos no futuro, pois é de extremo interesse observar as diferenças entre os parâmetros obtidos através de NPMs revestidas com citrato, um material de baixa biocompatibilidade, e NPMs revestidas com albumina, um material que naturalmente é encontrado no organismo e possui receptores próprios na BHE.

Concluiu-se que o sistema BAC apresentou boa performance para detectar a passagem de NPMs pelo cérebro de ratos.

Os dados relacionados ao tempo de circulação e a biodistribuição das NPMs após a ação do manitol irão elucidar ainda mais o comportamento dessas em sistemas biológicos, além de possibilitar novos estudos no tratamento e diagnósticos de neuropatologias, conciliando o uso de NPMs com manitol.

Sendo assim, a BAC tem se mostrado de grande valor nessa nova área devido às características intrínsecas da técnica (aquisição online, resolução temporal, custo e invasividade baixos).

Além disso, este trabalho abre diversas possibilidades para o uso em conjunto do manitol e de NPMs em relação à neuropatologias. Apesar dos estudos relacionando estes dois materiais, poucos são os que conseguem investigar diversos parâmetros, como $T_{1/2}$, biodistribuição, tempo de chegada, entre outros. Encontrou-se através deste trabalho um maior esclarecimento do comportamento de NPMs no encéfalo de ratos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wenger MA, Henderson EB, Dinning JS. Magnetometer Method for Recording Gastric Motility. *Science*. 1957;125(3255):990-1.
2. Wenger MA, Engel BT, Clemens TL, Cullen TD. Stomach motility in man as recorded by the magnetometer method. *Gastroenterology*. 1961;41:479-85.
3. Benmair Y, Dreyfuss F, Fischel B, Frei EH, Gilat T. Study of gastric emptying using a ferromagnetic tracer. *Gastroenterology*. 1977;73(5):1041-5.
4. Benmair Y, Fischel B, Frei EH, Gilat T. Evaluation of a magnetic method for the measurement of small intestinal transit time. *The American journal of gastroenterology*. 1977;68(5):470-5.
5. Miranda JR, Baffa O, de Oliveira RB, Matsuda NM. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Medical physics*. 1992;19(2):445-8.
6. Moraes R, Cora LA, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, Miranda JR. Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry. *Physiological measurement*. 2003;24(2):337-45.
7. Agostinho M, Americo MF, Marques RG, Zandona EA, Stelzer M, Cora LA, et al. AC Biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference*. 2010;2010:5740-3. Epub 2010/11/26.
8. Quini CC, Americo MF, Cora LA, Calabresi MF, Alvarez M, Oliveira RB, et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. *Journal of biological engineering*. 2012;6(1):6.
9. Cora LA, Andreis U, Romeiro FG, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, et al. Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry. *Physics in medicine and biology*. 2005;50(23):5523-34. Epub 2005/11/25.
10. Cora LA, Fonseca PR, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, Miranda JR. Influence of compression forces on tablets disintegration by AC Biosusceptometry. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2008;69(1):372-9. Epub 2008/01/01.
11. Quini CC, Matos JF, Próspero AG, Calabresi MF, Zufelato N, Bakuzis AF, et al. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2014.
12. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36(13):R167-R81.
13. Lubbe AS, Alexiou C, Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *The Journal of surgical research*. 2001;95(2):200-6.
14. Mou X, Ali Z, Li S, He N. Applications of Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery System. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2015;15(1):54-62.
15. Yigit MV, Moore A, Medarova Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. *Pharmaceutical research*. 2012;29(5):1180-8.
16. Huang HS, Hainfeld JF. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:2521-32.
17. Branquinho LC, Carriao MS, Costa AS, Zufelato N, Sousa MH, Miotto R, et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia (vol 3, 2887, 2013). *Sci Rep-Uk*. 2014;4.
18. Schaller V, Kraling U, Rusu C, Petersson K, Wipenmyr J, Krozer A, et al. Motion of nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient. *J Appl Phys*. 2008;104(9).
19. Carriao MS, Neto KS, Bakuzis AF. Mass magnetophoretic experiment applied to the separation of biocompatible magnetic nanoparticles with potential for magnetohyperthermia. *J Phys D Appl Phys*. 2014;47(2).

20. Rodrigues HF, Mello FM, Branquinho LC, Zufelato N, Silveira-Lacerda EP, Bakuzis AF. Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. *Int J Hyperther*. 2013;29(8):752-67.
21. Bakuzis AF, Branquinho LC, Castro LLE, Eloi MTDA, Miotto R. Chain formation and aging process in biocompatible polydisperse ferrofluids: Experimental investigation and Monte Carlo simulations. *Adv Colloid Interfac*. 2013;191:1-21.
22. Bakuzis AF, Morais PC, Pelegrini F. Surface and exchange anisotropy fields in MnFe₂O₄ nanoparticles: Size and temperature effects. *J Appl Phys*. 1999;85(10):7480-2.
23. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *The Journal of clinical investigation*. 1979;64(1):145-54.
24. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schafer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;299(2):775-81.
25. Lee H, Lee E, Kim DK, Jang NK, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(22):7383-9.
26. Schroeder U, Sommerfeld P, Ulrich S, Sabel BA. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1998;87(11):1305-7.
27. Tabatabaei SN, Girouard H, Carret AS, Martel S. Remote control of the permeability of the blood-brain barrier by magnetic heating of nanoparticles: A proof of concept for brain drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;206:49-57.
28. Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P, Liao W. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomaterials science*. 2016;4(2):219-29.
29. Vilella A, Ruozi B, Belletti D, Pederzoli F, Galliani M, Semeghini V, et al. Endocytosis of Nanomedicines: The Case of Glycopeptide Engineered PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2015;7(2):74-89.
30. Wohlfart S, Khalansky AS, Gelperina S, Maksimenko O, Bernreuther C, Glatzel M, et al. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PloS one*. 2011;6(5):e19121.
31. Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*. 2010;31(4):757-76.
32. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013;36(3):437-49.
33. Cottrell GT, Ferguson AV. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regulatory peptides*. 2004;117(1):11-23.
34. Krol S, Macrez R, Docagne F, Defer G, Laurent S, Rahman M, et al. Therapeutic benefits from nanoparticles: the potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier. *Chemical reviews*. 2013;113(3):1877-903.
35. Mangraviti A, Gullotti D, Tyler B, Brem H. Nanobiotechnology-based delivery strategies: New frontiers in brain tumor targeted therapies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016.
36. Chaichana KL, Zadnik P, Weingart JD, Olivi A, Gallia GL, Blakeley J, et al. Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. *Journal of neurosurgery*. 2013;118(4):812-20.
37. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):190-8.
38. Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cellular and molecular neurobiology*. 2000;20(2):217-30.
39. Muizelaar JP, Wei EP, Kontos HA, Becker DP. Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction and vasodilation in response to blood viscosity changes. *Journal of neurosurgery*. 1983;59(5):822-8.

40. Shawkat H. Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2012;12:82-6.
41. James HE. Methodology for the control of intracranial pressure with hypertonic mannitol. *Acta neurochirurgica*. 1980;51(3-4):161-72.
42. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;89(1):338-47.
43. Liu HL, Hua MY, Yang HW, Huang CY, Chu PC, Wu JS, et al. Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(34):15205-10.
44. Estevanato LL, Lacava LM, Carvalho LC, Azevedo RB, Silva O, Pelegrini F, et al. Long-term biodistribution and biocompatibility investigation of dextran-coated magnetite nanoparticle using mice as the animal model. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2012;8(2):301-8.
45. Gamarra LF, Pavon LF, Marti LC, Pontuschka WM, Mamani JB, Carneiro SM, et al. In vitro study of CD133 human stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine*. 2008;4(4):330-9.
46. Taupitz M, Schnorr J, Abramjuk C, Wagner S, Pilgrimm H, Hunigen H, 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 : JMRI*. 2000;12(6):905-11.
47. Wagner S, Schnorr J, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Investigative radiology*. 2002;37(4):167-77.
48. Wunderbaldinger P, Josephson L, Weissleder R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*. 2002;13(2):264-8.
49. Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(11):1252-65.
50. Goodwill PW, Scott GC, Stang PP, Conolly SM. Narrowband magnetic particle imaging. *IEEE Trans Med Imaging*. 2009;28(8):1231-7. Epub 2009/02/13.
51. Sorani MD, Morabito D, Rosenthal G, Giacomini KM, Manley GT. Characterizing the dose-response relationship between mannitol and intracranial pressure in traumatic brain injury patients using a high-frequency physiological data collection system. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(4):291-8.
52. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological reviews*. 2001;53(2):283-318.
53. Próspero AG. APLICAÇÃO DO SISTEMA DE BIOSUSCEPTOMETRIA AC PARA O MONITORAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA. Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2015.
54. Wagner S, Schnorr J, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging - Preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol*. 2002;37(4):167-77.
55. Kwon EJ, Skalak M, Lo Bu R, Bhatia SN. Neuron-Targeted Nanoparticle for siRNA Delivery to Traumatic Brain Injuries. *ACS nano*. 2016;10(8):7926-33.