

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/02/2021.

Biosusceptometria AC e nanopartículas magnéticas para avaliação de parâmetros biofísicos: renais, cerebrais e efeito corona

ANDRÉ GONÇALVES PRÓSPERO

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira

Biosusceptometria AC e nanopartículas magnéticas para avaliação de parâmetros biofísicos: renais, cerebrais e efeito corona

ANDRÉ GONÇALVES PRÓSPERO

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira

2019

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

BIBLIOTECARIA RESPONSÁVEL : ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Próspero, André Gonçalves.

Biosusceptometria AC e nanopartículas magnéticas para
avaliação de parâmetros biofísicos : renais, cerebrais e efeito
corona / André Gonçalves Próspero. - Botucatu , 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: Patrícia Fidelis de Oliveira

Capes: 20903006

1. Física médica. 2. Biofísica. 3. Biosusceptometria de
Corrente Alternada. 4. Nanopartículas. 5. Perfusão isolada
(Fisiologia). 6. Rins - Fisiologia. 7. Cérebro - Fisiologia.

Palavras-chave: biofísica cerebral; biofísica renal;
biosusceptometria AC; efeito corona; nanopartículas magnéticas.

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.

À minha companheira Sabrina Galetti Cherelli por estar sempre disponível e disposta a me ajudar no que for preciso nesses quase sete anos de relacionamento e quase cinco sob o mesmo teto, por me amar e ser a melhor companheira que eu poderia ter ao meu lado. Obrigado por me aturar, cuidar e zelar por mim. Agradeço também à sua família que sempre me acolhe e me trata como parte dela.

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

Agradeço ao meu irmão Alexandre Gonçalves Próspero, por me dar força, por estar ao meu lado durante toda minha vida e ter feito parte de muitas histórias que nos marcaram.

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

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 proporcionar uma série de oportunidades na carreira acadêmica - aqui destaco meu doutorado sanduíche no exterior, incentivo e apoio para obtenção da vaga de professor bolsista junto ao Dep. de Física e Biofísica, me autorizar contato direto com sua rede de

colaboradores e me permitir adicionar alguns novos colaboradores ao longo desses quatro anos. Por me ensinar muito e principalmente por me fazer descobrir aptidões e gosto pelo ensino e pela pesquisa. Agradeço também à sua esposa, professora Dra. Diana Rodrigues de Pina Miranda, por fazer, junto ao professor José Ricardo, dos grupos de pesquisa Biomag e Lafar uma grande família.

À professora Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira, 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, principalmente quando chego de última hora com uma série de problemas a serem resolvidos. Além disso agradeço também à todas as colaborações intelectuais presentes ao longo deste trabalho, onde sua presença está fortemente marcada nas discussões e interpretações fisiológicas e funcionais, que foram base do desenvolvimento e finalização do trabalho principal aqui apresentado.

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

Ao Departamento de Física e Biofísica, por me proporcionar a experiência da docência através de um programa de professor bolsista em três diferentes matérias oferecidas pelo departamento.

Ao professor Dr. Andris Figueiroa Bakuzis, por me proporcionar grandes experiências em seu laboratório, apresentar diferentes técnicas, métodos e instrumentações científicas, além dos constantes questionamentos com alto nível de complexidade, que me motivaram a passar noites em claro debruçado em livros e artigos científicos.

Ao professor Dr. Oswaldo Baffa Filho, por dedicar seu tempo e rede de colaborações a fim de viabilizar meu doutorado sanduíche no exterior, de me

proporcionar aprender sobre temas e instrumentações que estão na vanguarda da pesquisa em biomagnetismo a nível internacional e por me permitir participar do processo de “importação” dessa tecnologia e conhecimento. Além disso, agradeço por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte, futuramente, de seu grupo de pesquisa por meio da possibilidade de um projeto de pós doutorado sob sua supervisão.

Ao doutor Ronald Wakai, por me permitir fazer parte, temporariamente, de seu grupo de pesquisa. Por me receber de braços abertos em seu país, por ser sempre muito atencioso, educado, preocupado e amável. Por me proporcionar a possibilidade de trabalhar com técnicas e instrumentações que eu só conhecia dos livros. Além disso, gostaria de agradecer por, através dessa experiência internacional, me proporcionar um grande auto-conhecimento e me apresentar uma pluralidade de ideias e possibilidades no universo da pesquisa.

Aos amigos Luis Henrique, Luis Marçal e Luis Mauro, que conheci no exterior e criei grande amizade, que me suportaram e fortaleceram durante esse período no exterior. Em especial ao William J. Lutter (Bill) que, mesmo com uma grande distância de idade e cultura, se tornou um amigo a quem tenho muito apreço e carinho; obrigado por me ajudar na rotina do laboratório, por me ensinar suas funções, pelos almoços e longas conversas que muito fortaleceram meu tímido domínio da língua inglesa.

À todo pessoal da UNIPEX, principalmente a Dr. Camila Corrêa, Denise e Leandro, que viabilizaram a preparação e montagem das lâminas, assim como a obtenção das imagens histológicas aqui apresentadas.

Às doutoras Daniela Cristina dos Santos e Vanessa dos Santos Silva, que apesar de termos nos conhecido recentemente, colaboraram imensamente para o enriquecimento deste trabalho e elucidação de vários dados aqui apresentados. Obrigado por disponibilizarem seu tempo e esforços para que estruturássemos um trabalho

multidisciplinar sustentado pela suas experiências em nefrologia e nefropatologia. Aqui destaco a Dra. Daniela, que mesmo com sua intensa rotina no hospital, se desdobrou para nos receber, analisar as lâminas e discutir os resultados obtidos.

Ao doutor Carlos Alexandre Fernandes, à doutora Lucilene Delazari dos Santos e ao professor Marcos Fontes, por estabelecermos uma parceria sólida que possibilitou uma série de novas possibilidades de investigações científicas, além do entendimento de muito do que já havíamos realizado e iremos realizar no futuro. Em especial ao Carlos Alexandre, pelas conversas científicas, políticas e históricas na cozinha do laboratório, que culminaram no desenvolvimento de um projeto de pesquisa em associação com os pesquisadores citados acima.

Ao Guilherme Augusto Soares, ao Caio César Quini, ao Marcos Felipe Calabresi, ao Ronaldo Vitor Reis Matos, à Milena Foltran e à Nurya Pinheiro, pela grande amizade, 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 e de um professor. Por terem trabalhado comigo em muitos projetos e terem tido a paciência e entusiasmo necessários, cada qual em seu momento, para que atingíssemos nossos objetivos.

Aos amigos Alan Fattori Alves, Ana Luiza Pavan, Luís Gustavo de Oliveira Simões, Juliana Fernandes Matos, Leonardo Pinto, Gabriela Bittencourt, João Victor Carneiro, Gustavo Serafim, Deivid William Pires e Rodolfo Cicolin pela convivência mais próxima, pelos churrascos, encontros festivos e finalmente pela grande amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa que recebi durante esses quatro anos.

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

RESUMO

A proposta deste trabalho é inédita e consiste na aplicação do sistema de Biosusceptometria AC (BAC), associado à nanopartículas magnéticas (MNPs), a fim de disponibilizar uma nova ferramenta para estudos de função e fisiologia renal, cerebral e efeito corona. Foram realizados experimentos com ratos para o estudo de parâmetros biofísicos da dinâmica de perfusão de MNPs nos rins e cérebro, em situações normais e alteradas, bem como sua biodistribuição no organismo. Além disso empregamos o sistema BAC para avaliar as alterações em propriedades magnéticas e farmacocinéticas das MNPs quando em contato com fluidos biológicos (formação de corona proteica - CP). No estudo de perfusão e dinâmica renal estudamos diferentes fases de lesão renal induzida por doxorubicina, utilizando o sistema BAC para detectar as MNPs em trânsito nos rins do animal, bem como sua biodistribuição. O trabalho referente à dinâmica de perfusão cerebral utilizou o fármaco manitol, um conhecido disruptor hiperosmótico, para influenciar no fluxo sanguíneo cerebral e permeabilidade da barreira hematoencefálica. Assim, foi possível estudar as alterações que este fármaco causa no cérebro, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento envolvendo este órgão. Estudamos também a formação da CP nas MNPs, seus impactos em propriedades magnéticas e farmacocinéticas das MNPs. Este trabalho mostra que esses parâmetros são relacionados, uma vez que as MNPs com menor formação de CP apresentam menores alterações nas propriedades magnéticas das MNPs e maiores tempos de circulação.

Este trabalho contempla a aplicação de instrumentação física de baixo custo que subsidia aplicações na pesquisa do sistema renal e cerebral em modelos animais, além de novas aplicações de materiais nano estruturados em angiologia, nefrologia e

neurologia, o que proporcionará futuras inovações em instrumentação biomédica, farmacologia, ciência biomédica, nanomedicina e fisiologia.

ABSTRACT

This work consists in the application of the AC Biosusceptometry (ACB) system, associated with magnetic nanoparticles (MNPs), to provide a new tool for studies of renal and cerebral function and physiology, and corona effect as well. We performed experiments using rats to study biophysical parameters of the MNPs perfusion dynamics in the kidneys and brain, in normal and altered situations, as well as their biodistribution in the animals' body. Also, we applied the ACB system to evaluate changes in the MNPs magnetic and pharmacokinetic properties when in contact with biological fluids (corona protein formation - CP). In the renal perfusion dynamics studies, we accessed three phases of doxorubicin-induced kidney injury, using the ACB system to detect the transit of the MNPs in the animals' kidneys, as well as its biodistribution. In work regarding the dynamics of cerebral perfusion, we used the drug mannitol, a known hyperosmotic disruptor, to influence the cerebral blood flow and permeability of the blood-brain barrier. It was possible to study the changes that this drug causes in the brain, contributing to the development of new strategies for cerebral diagnosis and treatment using nanomedicines. We also studied the CP formation in MNPs, its impacts on the magnetic and pharmacokinetic properties of MNPs. This work shows that these parameters are related, since, the MNPs with lower CP formation, presented smaller differences in the magnetic properties of the MNPs and the greater circulation times.

This work was carried out with the objective of conducting applications of physics instrumentation on the renal and cerebral systems in animals, as well as new applications of nanomaterials in angiology, nephrology, and neurology, which gives innovative perspectives in biomedical instrumentation, pharmacology, biomedical science, nanomedicine, and physiology.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	12
Chapter 1 - AC biosusceptometry and magnetic nanoparticles to study doxorubicin-induced kidney injury in rats.....	21
Prefácio	22
Abstract.....	25
Introduction	26
Material and Methods	29
Results	35
Discussion.....	46
Conclusion	55
References	56
Chapter 2 - Dynamic cerebral perfusion parameters and magnetic nanoparticles accumulation accessed by AC biosusceptometry	66
Prefácio	67
Abstract.....	69
Introduction	70
Material and Methods	72
Results	77
Discussion.....	80
Conclusion	85
References	86
Chapter 3 - Impacts of the corona protein of three magnetic nanoparticles conjugations on the AC biosusceptometry signal intensity and circulation times... 	92
Prefácio	93
Abstract.....	96
Introduction	97
Material and Methods	99
Results	105
Discussion.....	112

Conclusion	118
References	119
CONCLUSÃO GERAL	127
REFERÊNCIAS CONCLUSÃO E INTRODUÇÃO GERAL	130

INTRODUÇÃO GERAL

Nanopartículas magnéticas (MNPs – do inglês *Magnetic Nanoparticles*) são materiais que possuem grande versatilidade. Seu tamanho reduzido aliado às suas propriedades magnéticas permite que estas estruturas interajam de várias formas diferentes dentro de um sistema biológico (1). Atualmente esses materiais têm grande visibilidade da comunidade científica, devido principalmente ao seu grande potencial terapêutico, isto é, associação de técnicas de terapia e diagnóstico utilizando o mesmo agente. Desta forma, MNPs podem atuar como agentes de contraste em procedimentos de MRI (do inglês – *Magnetic Resonance Imaging*) (2, 3) e imageamento por fluorescência (4), visando diagnósticos, ou serem utilizadas como sistemas de liberação de fármacos (5) e como agentes de tratamento por hipertermia magnética (6), visando terapias. Pode-se, ainda, associar algumas destas diferentes aplicações, a fim de promover o diagnóstico e terapia com as mesmas MNPs (7, 8).

A farmacocinética das MNPs é uma das principais preocupações quando estas são aplicadas em experimentos *in vivo* e procedimentos clínicos. Características como: potencial Zeta (afinidade eletrônica), diâmetro e revestimento das MNPs possibilitam diferentes alvos e destinos em um sistema biológico. Essas grandezas conferem às MNPs características de afinidade ou repulsão a certas estruturas presentes no plasma sanguíneo, tecidos, órgãos ou sistemas. Nesse sentido, estudos de caracterização pré-clínica, que tem como objetivo elucidar as relações entre a estrutura e a atividade das MNPs dentro de um organismo, são de grande importância na área (9-11).

Além das características das MNPs, outro fator de importância na farmacocinética das partículas são as características morfológicas e fisiológicas dos órgãos, sendo essas intimamente ligadas às suas funções. A relação entre as características dos órgãos e das

MNPs é alvo de vários estudos. Por exemplo, nanopartículas maiores do que 200 nm são seqüestradas por filtração física no baço (12), enquanto que nanopartículas menores do que 6 nm são rapidamente retiradas do sangue via depuração renal (4, 9). Sendo assim, MNPs com diâmetros entre 6 e 200 nm têm como seu principal destino final o sistema retículoendotelial, apresentando maiores acúmulos no fígado (9, 13, 14). Além das características dimensionais das MNPs, outra característica de fundamental importância no destino final das MNPs no organismo é sua interação com entidades presentes no sangue (15, 16).

A partir da administração endovenosa dessas MNPs, existem uma série de proteínas, agentes imunológicos e inflamatórios que podem interagir com as MNPs num processo chamado de formação de corona proteica (CP) (17, 18). Esse processo é basicamente o primeiro contato das MNPs com o organismo, onde as MNPs são envolvidas pelas proteínas e agentes imunológicos. O tipo e quantidade das entidades biológicas que interagem com as partículas dependem de alguns fatores como a quantidade dessas entidades no sangue, revestimento e tamanho das MNPs (19, 20). No geral, as entidades que apresentam maior interação com as MNPs são imunoglobulinas, componentes do sistema complemento e proteínas de alta concentração plasmática como a albumina e apolipoproteínas (20-22). Imunoglobulinas e componentes do sistema complemento são estruturas que reconhecidamente têm uma grande relação com reconhecimento fagocitário, ou seja, atuam como sinalizadores para células fagocitárias (como macrófagos, células de Kupffer, mastócitos, neutrófilos, entre outros) entrarem em ação (23, 24). Devido ao fato de que o fígado e o baço possuem em seu interstício um grande número dessas células, e a partir dessa sinalização pelos agentes imunológicos e inflamatórios, o fígado e baço compreendem os órgãos de maior captura de MNPs quando administradas endovenosamente (21, 25-27).

Dessa forma, investigações com o objetivo de relacionar o tipo e quantidade de entidades plasmáticas que interagem com MNPs com parâmetros farmacocinéticos como tempo de circulação, captação hepática e excreção renal, são de fundamental importância. Estudos deste tipo podem disponibilizar importantes informações, que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de novas estratégias que visam modular esses parâmetros para obter maior eficácia em tratamentos e diagnósticos envolvendo materiais nanoparticulados.

A captação destas MNPs no fígado tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, e as que antes se apresentaram como uma boa opção para a realização de marcação hepática em procedimentos de MRI (28), atualmente tem recebido críticas em relação ao tempo em que permanecem retidas no organismo (29). A fim de solucionar este problema, estudos recentes têm apontado para a utilização de MNPs que apresentem a via de excreção renal como principal via de eliminação das MNPs do organismo (4, 29, 30).

Devido às características morfofisiológicas dos rins, como a presença da unidade de filtração glomerular, da membrana basal e dos podócitos interdigitantes, este órgão tem a habilidade inata de depurar rapidamente nanomateriais com diâmetros menores do que 10 nm (4, 9). Apesar do diâmetro das MNPs ser o principal fator que influencia na depuração renal das MNPs, existem outros fatores que também influenciam neste parâmetro como, por exemplo, o potencial Zeta e a hidrofobicidade das MNPs, já que a seletividade de filtração glomerular é baseada na carga e hidrofobicidade das substâncias a serem depuradas (31). Dentro deste contexto, estudos que visam o melhor entendimento da relação entre os níveis de excreção renal e as características das MNPs, bem como da integridade da unidade de filtração glomerular com esses parâmetros, têm grande importância.

Em virtude dos efeitos deletérios causados nos rins por agentes de contrastes a base de iodo e gadolínio (32-34), MNPs têm sido propostas como uma alternativa segura para contraste, já que em relação aos meios de contraste a base de iodo e gadolínio, não apresenta nefrotoxicidade (34). Além da ausência de toxicidade renal, características das MNPs, como seu tamanho e versatilidade, viabilizaram a utilização destes materiais nanoestruturados em metodologias que visam maior eficácia no imageamento dos rins via MRI. Hultman, K. L. et al. (2008) utilizaram técnicas de marcação imunológica, tendo como alvo a marcação da medula renal de ratos (35). Este tipo de marcação tem grandes implicações em detecções de doenças específicas que atinjam a medula renal e em entrega de fármacos nesse local. Outros estudos, a fim de diagnosticar Falência Renal Aguda (FRA), mostraram que nanopartículas associadas a técnicas de MRI são capazes de detectar áreas isquêmicas nos rins de animais com FRA (36) e detectar lesões renais antes dos níveis de creatinina sérica se tornarem elevados (37). Estes resultados têm grande importância, uma vez que um aumento progressivo dos níveis de creatinina sérica é um dos principais parâmetros que indicam um possível quadro de FRA.

Um dos principais indicadores de nefropatias é a infiltração de macrófagos no tecido renal (glomérulo e interstício). Hauger, O. et al. (1999) utilizaram MNPs, associadas a técnicas de MRI para localizar macrófagos no tecido renal de animais com síndrome nefrótica previamente induzida (38). A técnica de localização de macrófagos no tecido renal descrita neste estudo ainda pode ser aplicada em diversos outros tipos de disfunções renais, como por exemplo, rejeição de transplantes e glomerulonefrite, que até o momento eram diagnosticadas unicamente por meio de biópsias. Nanopartículas de óxido de ferro associadas a técnicas de MRI também já foram utilizadas para quantificar inflamação renal de nefrite lúpica. Utilizando MNPs funcionalizadas com

recobrimento de fosfolipídios específicos, foi possível quantificar a progressão dos níveis de inflamação renal nos animais doentes por meio da diferença nos tempos de relaxação dos tecidos normais e dos tecidos marcados pelas MNPs funcionalizadas (39).

Nesse contexto, materiais nanoestruturados são de grande valia na área de nefrologia, pois apresentaram bons resultados quando empregadas em estudos de diferentes disfunções renais como nefropatias, progressão de lesões crônicas e detecção precoce de FRA.

Devido às propriedades das MNPs já citadas anteriormente, essas partículas podem acessar locais e estruturas que são pouco acessíveis por meio de outros métodos (40). Neste contexto, outras aplicações das MNPs que têm recebido grande atenção da comunidade científica são a entrega de drogas e realização de tratamentos envolvendo o sistema nervoso central, mais especificamente o tecido cerebral (40, 41). Um grande obstáculo na entrega de agentes terapêuticos no tecido cerebral é a barreira hematoencefálica. Esta barreira, que envolve vasos sanguíneos do sistema nervoso central, tem como principal função impedir a entrada de substâncias tóxicas e agentes patogênicos no cérebro, assim como também manter a homeostase deste órgão (42).

Abordagens que visam alternativas eficientes para melhorar os resultados de diagnóstico e tratamento do tecido cerebral são de grande importância. Recentemente, estudos envolvendo a associação e combinações de técnicas, como a modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica e a aplicação e detecção de nanocarreadores, são fundamentais para atingir este objetivo (43). Uma dessas abordagens é a utilização do fármaco manitol (um disruptor hiperosmótico que modula a permeabilidade da barreira hematoencefálica) associado à MNPs. Utilizando essa abordagem, Kim et al. (2006) conseguiram alcançar concentrações significativas de

MNPs no cérebro com uma administração prévia deste fármaco, porém os métodos de avaliação dessa entrega utilizados nesse estudo forneceram apenas dados qualitativos (44). Vale ressaltar que ainda existe uma deficiência de técnicas e métodos capazes de avaliar os resultados de entrega e perfusão cerebral de MNPs de forma quantitativa. Assim, novas tecnologias que são capazes de realizar essas aferições e que apresentem características como baixo custo, fácil manuseio e versáteis são de vital importância para estudos pré-clínicos envolvendo essas abordagens. Tais técnicas podem ser úteis para facilitar as investigações do uso de nanocarreadores magnéticos aplicados ao cérebro, e conseqüentemente ter impactos tanto no tempo quanto no custo envolvido no desenvolvimento destas novas abordagens que utilizam nanocarreadores magnéticos (45).

Atualmente existem poucas técnicas que são capazes de detectar as MNPs *in vivo* por meio de suas características magnéticas, sendo as principais o MRI (46) e o sistema de Imagiamento de Partículas Magnéticas (MPI – do inglês *Magnetic Particle Imaging*) (47), porém esses sistemas possuem limitações que estimulam a busca por novas instrumentações capazes de detectar as MNPs a partir de suas propriedades magnéticas. As técnicas padrão de MRI e seus protocolos para avaliações funcionais (fMR do inglês – *functional Magnetic Resonance*) apesar de possuírem boa resolução espacial, são técnicas de custo elevado que dependem de um ambiente controlado, o que dificulta sua associação com outros sistemas, limitando as possíveis aplicações terapêuticas das MNPs. Vale ressaltar, ainda, que a fMR 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 (48). O sistema MPI tem tido muita atenção nos últimos anos devido à sua resolução espacial principalmente, na ordem de milímetros (47), porém esse sistema também limita a

associação de técnicas a fim de explorar as propriedades teranósticas das MNPs. Além disso, esse sistema têm sido aplicado apenas em imageamento de pequenos animais, devido à sua alta complexidade, sendo que existem apenas estudos de viabilidade, através de simulações, de um sistema com capacidade e segurança para aplicação em humanos (49, 50).

Dessa forma, a busca por novas técnicas e instrumentações mais simples, de baixo custo e que tragam novas perspectivas no estudo de parâmetros relacionados com função renal, cerebral e interação das MNPs com entidades plasmáticas são de grande importância, uma vez que existe a falta de técnicas capazes de interagir com estes materiais nanoestruturados *in vivo* de maneira minimamente invasiva, com alta resolução temporal e custos acessíveis.

Dentro deste contexto, a técnica de Biosusceptometria AC (BAC) aparece como uma valiosa nova ferramenta para a detecção de MNPs *in vivo* e em tempo real. A 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 alta resolução temporal, baixo custo, versatilidade, portabilidade e ausência de radiação ionizante.

Desde suas primeiras aplicações, os estudos envolvendo BAC são focados, principalmente, em avaliação de parâmetros envolvendo o trato gastrointestinal de humanos (51-54). Desde o surgimento dessa técnica até os dias atuais, muitas aplicações foram exploradas, como: avaliação de motilidade gástrica (55-57), trânsito gastrointestinal (58-60), esvaziamento gástrico (53, 60, 61) e farmacotécnica (62-64). Até 2012, eram utilizadas partículas de material ferromagnético (ferrita de manganês) como material traçador. As partículas apresentavam diâmetros na ordem de 50 a 100 μm e não

eram absorvidas pelo organismo, sendo excretadas via fezes. Quini et al. (2012) propôs a associação de MNPs com o sistema BAC para avaliar trânsito e esvaziamento de líquidos, o que possibilitou o surgimento de uma nova linha de pesquisa, baseada no monitoramento das MNPs em órgãos e tecidos, o que não era possível até então devido às limitações dimensionais do material e de suas propriedades magnéticas (60, 65).

A associação de MNPs com o sistema BAC se mostra de extrema relevância, já que atuam, respectivamente, como traçador magnético e detector de materiais magnéticos empregados em estudos fisiológicos. Os métodos utilizados até o momento apresentam uma série de inviabilidades, como já citado. A Biosusceptometria AC associada às MNPs fornece, então, uma alternativa versátil de baixo custo para o estudo de parâmetros relacionados com a biofísica renal e cerebral em tempo real e *in vivo* (27, 45, 65, 66), além de ser capaz de realizar aferições sobre a quantidade de material magnético acumulado em cada órgão *ex vivo* (67, 68), e os impactos da formação de corona proteica nas propriedades magnéticas das MNPs. 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 cintilografias, além de baixa resolução temporal em MRI.

Vale ressaltar que as MNPs que utilizamos aqui, MNPs de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$) possuem propriedades magnéticas muito interessantes. A magnetização dos materiais depende do volume do material magnético, e devido ao fato de que as MNPs aqui utilizadas terem dimensões de aproximadamente 15nm, interagir com materiais nesta dimensão por meios de campos magnéticos pode ser um desafio. Entretanto, as MNPs de ferrita de manganês utilizadas nestes estudos, foram desenvolvidas objetivando melhor sensibilidade pelo sistema BAC, e, devido à sua estrutura e composição, apresentam ótima resposta magnética quando imersas em campos

magnéticos de baixa amplitude, como o caso do sistema BAC, o que nos motivou a aplicá-las como traçador magnético nanoestruturado para o sistema BAC (65, 69).

Desta forma, a presente tese de doutorado envolve a aplicação do sistema de Biosusceptometria AC para a avaliação de parâmetros relacionados a biofísica da dinâmica renal e cerebral, além de estudar os impactos da formação da corona proteica em parâmetros farmacocinéticos e magnéticos das MNPs. Nos últimos anos nosso grupo tem realizado uma série de trabalhos envolvendo o uso do sistema BAC para a detecção de MNPs. Aqui apresentaremos pela primeira vez a utilização deste sistema associado às MNPs para o estudo de disfuncionalidades de órgãos como os rins e o cérebro. A partir da indução de uma lesão renal grave, que se assemelha a uma doença crônica renal (a glomerulo esclerose focal e segmentar) pudemos investigar os parâmetros de perfusão das MNPs pelos rins bem como o acúmulo das MNPs por estes órgãos em animais saudáveis e lesionados. Estudamos também os efeitos do manitol sobre a distribuição de MNPs no cérebro, associando MNPs como traçadores e o sistema BAC como detector *in vivo*. Além disso, o terceiro e último capítulo contempla o estudo da formação da corona proteica e seus impactos no tempo de circulação das MNPs e intensidade de sinal do sistema BAC. Acreditamos que os dados aqui apresentados subsidiem avaliações anteriores já publicados pelo grupo e apresentam novas abordagens que aumentam as aplicabilidades do sistema BAC, fornecendo uma ferramenta alternativa, de baixo custo, fácil manuseio e versátil para estudos pré-clínicos envolvendo materiais magnéticos nanoestruturados.

CONCLUSÃO GERAL

A presente tese de doutorado envolve a aplicação do sistema de Biosusceptometria AC para a avaliação de parâmetros relacionados a biofísica da dinâmica renal e cerebral, além de estudar os impactos da formação da corona proteica em parâmetros farmacocinéticos e magnéticos das MNPs. Aqui apresentamos pela primeira vez a utilização deste sistema associado às MNPs para o estudo de disfuncionalidades de órgãos como os rins e o cérebro.

A partir da indução de uma lesão renal grave, induzida por administração única de doxorrubicina, pudemos investigar os parâmetros de perfusão das MNPs pelos rins bem como o acúmulo das MNPs por estes órgãos em animais saudáveis e lesionados. Os resultados obtidos das análises realizadas pelo sistema BAC, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, se apresentaram fortemente em concordância com os dados obtidos via teste bioquímico padrão e análises morfológicas. Esses dados fortalecem o uso do sistema BAC e MNPs para estudos que envolvem o estudo e acompanhamento de disfunções relacionadas com alterações no perfil de perfusão e fluxo sanguíneo nos rins. O desenvolvimento de novas tecnologias de baixo custo e que forneçam dados mais rapidamente de parâmetros ligados à evolução de doenças renais se mostra de grande valia, uma vez que pode diminuir custos e acelerar o processo de desenvolvimento de novas estratégias de diagnósticos e tratamentos envolvendo os rins. Sendo assim, esse trabalho viabiliza o uso de uma tecnologia simples, de baixo custo e versátil para investigações e desenvolvimento de nanocarreadores e nanotraçadores magnéticos como uma alternativa aos meios de contraste e instrumentações padrão utilizados para avaliações funcionais dos rins, que como já citado, apresentam algumas desvantagens.

Estudamos também os efeitos do manitol sobre a distribuição de MNPs no cérebro, associando MNPs como traçadores e o sistema BAC como detector *in vivo*. Para os estudos *in vitro*, aplicamos uma nova variação do sensor padrão do sistema BAC, o “sensor de cavidade”. Apresentamos aqui, pela primeira vez, a caracterização deste sensor, que foi capaz de quantificar o depósito de MNPs nos tecidos com uma sensibilidade de quase uma ordem de grandeza maior do que o sensor convencional. Sendo assim, o sistema BAC e as MNPs foram capazes de detectar variações na dinâmica de perfusão cerebral, bem como o acúmulo de MNPs no cérebro. Acreditamos que o uso da BAC associada à MNPs possa também contribuir nas áreas de desenvolvimento de MNPs específicas para aplicações como traçadores ou sistemas de liberação de drogas focados neste órgão tão importante e difícil de acessar, que é o cérebro.

O terceiro e último capítulo contemplou o estudo da formação da corona proteica e seus impactos no tempo de circulação das MNPs e intensidade de sinal do sistema BAC. Apesar de que ainda faltam alguns dados a serem coletados, os dados obtidos até o momento indicam que a formação de corona proteica pode influenciar em propriedades magnéticas das MNPs. Além disso, as MNPs com cargas superficiais mais intensas (tanto negativas quanto positivas) apresentaram maior formação e densidade de corona proteica do que as MNPs mais próximas da neutralidade de cargas superficiais (BSA-MNPs), como mostraram as análises de eletroforese em gel SDS-PAGE. As partículas revestidas com citrato que foram analisadas pela espectrometria de massas, apresentaram interações com uma série de agentes imunológicos e inflamatórios, provavelmente por interações inespecíficas, o que refletiu no tempo de circulação dessas MNPs. Os tempos de circulação das três conjugações de MNPs aparecem fortemente relacionados com a formação de corona proteica, onde as MNPs que mostraram

formação de corona proteica mais intensa foram os que apresentaram os menores tempos de circulação. Ainda deveremos finalizar este estudo com os dados que ainda serão obtidos da espectrometria de massas, porém os dados obtidos até o momento sugerem que as BSA-MNPs são a conjugação que apresenta perfil diferente de corona proteica e menor interação com proteínas do que as outras partículas que tinham maior densidades de cargas superficiais. Os dados obtidos para as BSA-MNPs foram muito interessantes, onde essa conjugação foi a que apresentou menor efeito corona e conseqüentemente maior tempo de circulação, o que sugere uma maior biocompatibilidade e eficácia quando usada em tratamentos de tumores (quando usada a estratégia de *targeting* passivo, baseada no efeito de aumento de permeabilidade e retenção) ou como agentes de contraste em angiografias em procedimentos de MRI.

Acreditamos que os dados aqui apresentados subsidiem avaliações anteriores já publicados pelo grupo e apresentam novas abordagens que aumentam as aplicabilidades do sistema BAC, fornecendo uma ferramenta alternativa, de baixo custo, fácil manuseio e versátil para estudos pré-clínicos envolvendo materiais magnéticos nanoestruturados.

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO E CONCLUSÃO GERAL

1. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36(13):R167-R81.
2. Chertok B, Moffat BA, David AE, Yu FQ, Bergemann C, Ross BD, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*. 2008;29(4):487-96.
3. 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. *J Magn Reson Imaging*. 2000;12(6):905-11.
4. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ity Ipe B, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol*. 2007;25(10):1165-70. Epub 2007/09/25.
5. Pradhan P, Giri J, Rieken F, Koch C, Mykhaylyk O, Doblinger M, et al. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;142(1):108-21. Epub 2009/10/13.
6. Huang HS, Hainfeld JF. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:2521-32. Epub 2013/08/01.
7. Shubayev VI, Pisanic TR, 2nd, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):467-77. Epub 2009/04/25.
8. Singh A, Sahoo SK. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theragnostics. *Drug Discov Today*. 2014;19(4):474-81. Epub 2013/10/22.
9. Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(11):1252-65. Epub 2008/06/19.

10. Lubbe AS, Bergemann C, Huhnt W, Fricke T, Riess H, Brock JW, et al. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer research*. 1996;56(20):4694-701. Epub 1996/10/15.
11. Albanese A, Tang PS, Chan WC. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. 2012;14:1-16. Epub 2012/04/25.
12. Chen LT, Weiss L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood*. 1973;41(4):529-37. Epub 1973/04/01.
13. Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol*. 2010;188(6):759-68.
14. Gamarra LF, daCosta-Filho AJ, Mamani JB, de Cassia Ruiz R, Pavon LF, Sibov TT, et al. Ferromagnetic resonance for the quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological materials. *International journal of nanomedicine*. 2010;5:203-11. Epub 2010/05/14.
15. Yallapu MM, Chauhan N, Othman SF, Khalilzad-Sharghi V, Ebeling MC, Khan S, et al. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2015;46:1-12.
16. Caracciolo G, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Biological identity of nanoparticles in vivo: clinical implications of the protein corona. *Trends in biotechnology*. 2017;35(3):257-64.
17. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*. 2012;7(12):779-86.

18. Docter D, Distler U, Storck W, Kuharev J, Wünsch D, Hahlbrock A, et al. Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nature protocols*. 2014;9(9):2030.
19. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008.
20. Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, Coullerez G, Hofmann-Antenbrink M, Vries M, et al. Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona. *Biomaterials science*. 2015;3(2):265-78.
21. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):428-37. Epub 2009/04/21.
22. Thode K, Lück M, Semmler W, Müller RH, Kresse M. Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: sample preparation. *Pharmaceutical research*. 1997;14(7):905-10.
23. Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2006;307(1):93-102.
24. Moghimi SM, Patel H. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system—the concept of tissue specificity. *Advanced drug delivery reviews*. 1998;32(1-2):45-60.
25. Chertok B, Cole AJ, David AE, Yang VC. Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy and Inductively-Coupled Plasma Optical Emission

Spectroscopy for Biodistribution Analysis of Iron-Oxide Nanoparticles. *Mol Pharmaceut.* 2010;7(2):375-85.

26. 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. Epub 2012/04/21.

27. Quini CC, Prospero AG, Calabresi MFF, Moretto GM, Zufelato N, Krishnan S, et al. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine.* 2017;13(4):1519-29.

28. Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *European radiology.* 2003;13(6):1266-76. Epub 2003/05/24.

29. Yu M, Zheng J. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. *ACS nano.* 2015;9(7):6655-74. Epub 2015/07/08.

30. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond).* 2008;3(5):703-17. Epub 2008/09/27.

31. Brede C, Labhassetwar V. Applications of nanoparticles in the detection and treatment of kidney diseases. *Advances in chronic kidney disease.* 2013;20(6):454-65. Epub 2013/11/12.

32. Cigarroa RG, Lange RA, Williams RH, Hillis LD. Dosing of contrast material to prevent contrast nephropathy in patients with renal disease. *The American journal of medicine.* 1989;86(6 Pt 1):649-52. Epub 1989/06/01.

33. Manske CL, Sprafka JM, Strony JT, Wang Y. Contrast nephropathy in azotemic diabetic patients undergoing coronary angiography. *The American journal of medicine.* 1990;89(5):615-20. Epub 1990/11/01.
34. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney international.* 2009;75(5):465-74. Epub 2008/10/10.
35. Hultman KL, Raffo AJ, Grzenda AL, Harris PE, Brown TR, O'Brien S. Magnetic resonance imaging of major histocompatibility class II expression in the renal medulla using immunotargeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *ACS nano.* 2008;2(3):477-84. Epub 2009/02/12.
36. Kobayashi H, Jo SK, Kawamoto S, Yasuda H, Hu X, Knopp MV, et al. Polyamine dendrimer-based MRI contrast agents for functional kidney imaging to diagnose acute renal failure. *J Magn Reson Imaging.* 2004;20(3):512-8. Epub 2004/08/28.
37. Dear JW, Kobayashi H, Brechbiel MW, Star RA. Imaging acute renal failure with polyamine dendrimer-based MRI contrast agents. *Nephron Clinical practice.* 2006;103(2):c45-9. Epub 2006/03/18.
38. Hauger O, Delalande C, Trillaud H, Deminiere C, Quesson B, Kahn H, et al. MR imaging of intrarenal macrophage infiltration in an experimental model of nephrotic syndrome. *Magnetic resonance in medicine.* 1999;41(1):156-62. Epub 1999/02/20.
39. Serkova NJ, Renner B, Larsen BA, Stoldt CR, Hasebroock KM, Bradshaw-Pierce EL, et al. Renal Inflammation: Targeted Iron Oxide Nanoparticles for Molecular MR Imaging in Mice. *Radiology.* 2010;255(2):517-26.

40. 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. Epub 1998/11/13.
41. 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. Epub 2015/03/01.
42. 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.
43. 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.
44. 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. Epub 2005/10/21.
45. Prospero AG, Quini CC, Bakuzis AF, Fidelis-de-Oliveira P, Moretto GM, Mello FP, et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *Journal of nanobiotechnology*. 2017;15(1):22.
46. Jain TK, Richey J, Strand M, Leslie-Pelecky DL, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2008;29(29):4012-21.
47. Weizenecker J, Gleich B, Rahmer J, Dahnke H, Borgert J. Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging. *Physics in medicine and biology*. 2009;54(5):L1-L10. Epub 2009/02/11.

48. Marciani L. Assessment of gastrointestinal motor functions by MRI: a comprehensive review. *Neurogastroent Motil.* 2011;23(5):399-407.
49. Saritas EU, Goodwill PW, Zhang GZ, Yu W, Conolly SM. Safety Limits for Human-Size Magnetic Particle Imaging Systems. *Springer Proceedings in Physics.* 2012;140(Magnetic Particle Imaging):325-30.
50. Lyu X, Wang Z, Wei SF, Deng L, Yang WH. Design and Optimization for a Novel Field Free Line Generation Magnet for Human Target Clinical MPI-A Preliminary Study. *Ieee T Magn.* 2014;50(11).
51. Wenger MA, Henderson EB, Dinning JS. Magnetometer Method for Recording Gastric Motility. *Science.* 1957;125(3255):990-1.
52. Wenger MA, Clemens TL, Cullen TD, Engel BT. Stomach Motility in Man as Recorded by Magnetometer Method. *Gastroenterology.* 1961;41(5):479-&.
53. Benmair Y, Dreyfuss F, Fischel B, Frei EH, Gilat T. Study of Gastric-Emptying Using a Ferromagnetic Tracer. *Gastroenterology.* 1977;73(5):1041-5.
54. Benmair Y, Fischel B, Frei EH, Gilat T. Evaluation of a Magnetic Method for Measurement of Small Intestinal Transit-Time. *Am J Gastroenterol.* 1977;68(5):470-5.
55. Americo MF, Oliveira RB, Romeiro FG, Baffa O, Cora LA, Miranda JR. Scintigraphic validation of AC Biosusceptometry to study the gastric motor activity and the intragastric distribution of food in humans. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society.* 2007;19(10):804-11. Epub 2007/09/22.
56. Miranda JRA, Oliveira RB, Sousa PL, Braga FJH, Baffa O. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. *Physics in medicine and biology.* 1997;42(9):1791-9.

57. Andreis U, Americo MF, Cora LA, Oliveira RB, Baffa O, Miranda JR. Gastric motility evaluated by electrogastrography and alternating current biosusceptometry in dogs. *Physiological measurement*. 2008;29(9):1023-31. Epub 2008/08/14.
58. Baffa O, Oliveira RB, Miranda JR, Troncon LE. Analysis and development of AC biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements. *Medical & biological engineering & computing*. 1995;33(3):353-7. Epub 1995/05/01.
59. Miquelin CA, Braga FJ, Dantas RO, Oliveira RB, Baffa O. Pharyngeal clearance and pharyngeal transit time determined by a biomagnetic method in normal humans. *Dysphagia*. 2001;16(4):308-12. Epub 2001/11/27.
60. Quini CC, Americo MF, Cora LA, Calabresi MFF, 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).
61. Miranda JRA, Oliveira RB, Matsuda NM, Baffa O. Susceptometric Measurement of Gastric-Emptying. *Int Congr Ser*. 1992;988:635-8.
62. Cora A, 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.
63. Cora LA, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, Moraes R, Romeiro FG, et al. Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;56(3):413-20.
64. Cora LA, Americo MF, Romeiro FG, Oliveira RB, Miranda JRA. Pharmaceutical applications of AC Biosusceptometry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):67-77.

65. 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.
66. Quini CC, Matos JF, Prospero AG, Calabresi MFF, Zufelato N, Bakuzis AF, et al. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2015;380:2-6.
67. Quini CC. Análise dinâmica da perfusão e biodistribuição de nanopartículas magnéticas por biosusceptometria AC. Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2015.
68. Quini CC, Próspero AG, Kondiles BR, Chaboub L, Hogan MK, Baffa O, et al. Development of a protocol to assess cell internalization and tissue uptake of magnetic nanoparticles by AC Biosusceptometry. *J Magn Magn Mater*. 2019;473:527-33.
69. Lee JH, Huh YM, Jun Y, Seo J, Jang J, Song HT, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*. 2007;13(1):95-9.