

TEMPO DE PERMANÊNCIA E BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM RATOS: RESULTADOS INICIAIS

A. G. Próspero*, P. F. de Oliveira*, R. V. R. Matos*, C. C. Quini*, J. I. F. de Gobbi*, J. F. Matos*, N. Zufelato**, A. F. Bakuzis** e J. R. A. Miranda*

*UNESP, Botucatu, Brasil

** UFG, Goiânia, Brasil

e-mail: agprospero@ibb.unesp.br

Resumo: A associação das técnicas biomagnéticas e nanotecnologia possibilita novas aplicações para avaliação de parâmetros fisiológicos, como dinâmica de perfusão em órgãos e tecidos. Neste trabalho, através da técnica de Biosusceptometria AC (BAC), estudamos o tempo de circulação ($T_{1/2}$) e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês em ratos após 20 minutos da infusão. Nós encontramos um tempo médio de circulação de 181,06 s (desvio padrão = 49,43) e biodistribuição predominante para o fígado, pulmão e baço devido às características tanto das partículas quanto destes órgãos. Estes dados comprovam a eficiência da técnica na verificação destes parâmetros, e sugerem a utilização da BAC para avaliar diferentes nanopartículas, que possuam um tempo maior de circulação.

Palavras-chave: Biosusceptometria AC, nanopartículas magnéticas, biodistribuição, ferrita de manganês.

Abstract:

The Association between nanotechnology and biomagnetic diagnostic techniques unwrapped a whole new research field that allows us to noninvasively study physiological parameters, such as dynamic perfusion and retention in organs and tissues. By associating the AC Biosusceptometry (ACB) system to magnetic iron oxide nanoparticles doped with manganese, we analyzed circulation time and biodistribution patterns for these particles after 20 minutes of infusion. We found a circulation time of 181.06 s (SD = 49.43), with major biodistribution to liver, lungs and spleen, given the particles features and the organs morphology. Our results showed the system efficiency on particles tracing and bloodstream patterns assessments, and suggest the use of less-reactive nanoparticles with a higher circulation time in the body.

Keywords: AC Biosusceptometry, magnetic nanoparticles, biodistribution and manganese ferrite.

Introdução

A Biosusceptometria AC é uma técnica bem estabelecida na área de gastroenterologia e seus princípios de funcionamento são descritos pelo eletromagnetismo clássico [1]. Em relação a outros sistemas já consagrados, a BAC apresenta vantagens como o baixo custo, versatilidade, baixíssima invasividade, portabilidade e ausência de radiação

ionizante [2]. Até 2012, foram utilizadas partículas de material ferromagnético (ferrita de manganês) como material traçador. As partículas apresentavam tamanho na ordem de 50 a 100 μm e não eram absorvidas pelo organismo, sendo excretadas via fezes. Quini et al. (2012) propôs a aplicação de nanopartículas magnéticas para avaliar trânsito e esvaziamento de líquidos, o que possibilitou uma nova linha de instrumentação do sistema BAC, baseada no monitoramento dessas nanopartículas em órgãos e tecidos, que não era possível até então devido às limitações dimensionais do material [3].

Nanopartículas magnéticas (MNPs) 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 [4]. MNPs já são utilizadas como contrastes na ressonância magnética, devido a sua alta susceptibilidade magnética e meia vida mais longa na corrente sanguínea [5].

Neste trabalho, a partir da associação de MNPs com o sistema BAC, foi obtido o tempo de circulação médio ($T_{1/2}$) das partículas no sistema circulatório do animal. Visando uma aplicação de materiais magnéticos nano estruturados como contraste em estudos de perfusão de órgãos e sistemas, este trabalho analisa o perfil de biodistribuição em órgãos específicos.

Materiais e métodos

Para a realização deste experimento foram utilizados 5 ratos adultos (*Rattus norvegicus albinus* – linhagem Wistar), machos, com peso médio de 356,8g (desvio padrão = 24,84), provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu, mantidos em condições e local adequado (protocolo comitê de ética em experimentação animal CEUA - IBB nº 532).

Os animais foram anestesiados com uretano (99% - 1,5 mg/Kg) e submetidos à cirurgia de canulação de veia femoral para as administrações endovenosas das nanopartículas.

Foram utilizadas para a administração endovenosa, MNPs de ferrita de Manganês (MnFe_2O_4) recobertas com citrato, de diâmetro médio (método de Scherrer) de 13,4 nm e saturação de magnetização de 264 emu/cm^3 . A ferrita de Manganês foi escolhida como

material traçador devido à sua alta susceptibilidade magnética, com o objetivo de otimizar o sistema de detecção.

As nanopartículas se encontravam dispersas em solução fisiológica (solução salina 0,9%) numa concentração de 23 mg/ml com pH 6,2 [6]. As administrações endovenosas de MNPs foram feitas utilizando suspensão de 0,3 mL.

Alguns animais receberam infusões múltiplas de MNPs a fim de estudar a saturação de captação e perfil de biodistribuição. O animal 1 recebeu uma infusão, o animal 2 recebeu duas infusões e o restante receberam três infusões de nanopartículas magnéticas.

O sensor foi posicionado sobre a cavidade torácica, com o objetivo de aproximá-lo do coração do animal. A aquisição de sinal foi feita online por Lock-in (Standford Research System®) e sistema Biopac®, na frequência de aquisição de 200 Hz.

Os tempos de circulação em cada animal foram quantificados através do tempo em que a intensidade do sinal adquirido leva para decair pela metade em relação ao seu pico de intensidade ($T_{1/2}$). O tempo de chegada das MNPs no coração (TC) também foi analisado, calculado através do momento da infusão até o valor máximo de sinal adquirido.

Para a análise de biodistribuição os animais foram sacrificados após 20 minutos da infusão e os órgãos de interesse foram coletados: coração, pulmões, fígado, rins e baço. A análise de concentração de material magnético foi feita através do sistema BAC, onde cada órgão foi posicionado no centro da superfície de detecção do sensor para aquisição da intensidade de sinal.

Resultados

A. Tempo de permanência das nanopartículas no sistema circulatório dos animais

Os sinais de passagem das nanopartículas no sistema circulatório dos animais apresentaram perfis semelhantes. A Figura 1 mostra a variação de intensidade de sinal no tempo para o rato 5, onde a intensidade de sinal corresponde à concentração de MNPs:

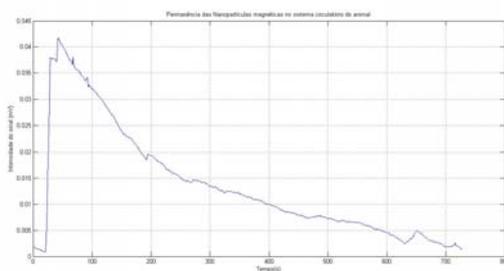


Fig. 1 Variação da concentração de MNPs no sistema circulatório do animal.

Os valores de $T_{1/2}$ e TC são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 - $T_{1/2}$, tempo de chegada (TC) e peso dos animais.

Animal	$T_{1/2}$ (s)	TC (s)	Peso(g)
Rato1	207,74	28,38	375
Rato2	263,75	25,75	347
Rato3	136,70	15,43	341
Rato4	131,47	21,95	326
Rato5	165,63	29,06	395
Média	181,06	24,11	356,8
Desvio Padrão	49,43	5,01	24,84

B. Parâmetros biodistributivos

Observou-se um perfil de biodistribuição das nanopartículas predominantemente para o fígado, seguido de pulmão e baço. Nos órgãos dos animais que receberam mais de uma infusão, detectamos maior acúmulo de material magnético (maior amplitude de sinal). Como pode ser observado na Figura 2, o rato 1 que recebeu apenas uma infusão, apresentou o menor acúmulo de MNPs enquanto o rato 2, que recebeu duas infusões, apresentou uma maior retenção em relação ao rato 1. Os ratos 3, 4 e 5, que receberam três infusões, apresentaram os maiores amplitudes de sinal, indicando maior retenção do traçador magnético.

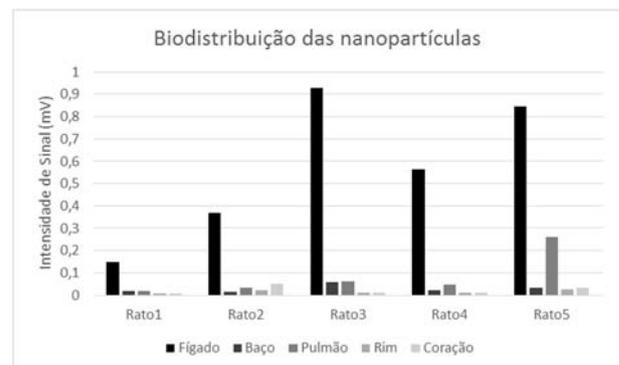


Fig. 2 Distribuição da intensidade de sinal (BAC) em relação a cada órgão coletado e cada animal.

A Figura 3 apresenta a média dos sinais obtidos pelo sistema BAC sobre os órgãos dos animais que receberam três infusões de nanopartículas.

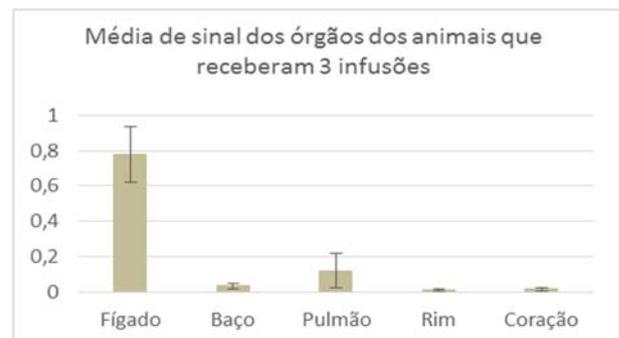


Fig. 3 Média de sinal dos órgãos dos animais que receberam três infusões de MNPs.

Discussão

A. Tempo de permanência das nanopartículas no sistema circulatório dos animais

Em todos os animais foi obtida o mesmo perfil de variação de sinal, com um pico acentuado na chegada das nanopartículas no coração e um decaimento representando a captação e/ou retenção do volume de nanopartículas infundido. Observamos que, para um volume de infusão de 0,3ml de MNPs, o $T_{1/2}$ médio foi de $181,06 \pm 49,43$ segundos, ou seja, neste tempo metade das MNPs foram captadas ou ficaram retidas em diferentes órgãos, tecidos e sistemas. Os tempos de chegada da infusão no coração apresentaram uma média de $24,11 \pm 5,01$ segundos, essa diferença nos tempos de chegada acontece pelo fato da administração do material ser realizada manualmente através de uma seringa, o que diminui a precisão no tempo e no perfil da infusão. Foi realizada uma comparação entre os $T_{1/2}$, TCs e o peso dos animais, a fim de encontrar uma correlação, porém o resultado encontrado não foi significativo. Na literatura foram encontrados trabalhos que avaliam o $T_{1/2}$ de MNPs no sangue, apresentando um $T_{1/2}$ de aproximadamente 21 minutos em ratos e 36 minutos em porcos [7]. Entretanto esse tempo foi adquirido offline através da retirada do sangue em tempos controlados, quantificados via espectroscopia por ressonância magnética e foram obtidos de MNPs com características semelhantes, porém com tamanhos e revestimentos diferentes das utilizadas neste trabalho, o que pode explicar as diferenças encontradas com os dados da literatura. Ainda assim existem, também, trabalhos que analisam a remanescência, utilizando métodos de aferição altamente sensíveis, como a marcação das MNPs com materiais radioativos, que encontram quantidades remanescentes na circulação por períodos de tempo maiores. Nestes trabalhos foi encontrado um tempo de remanescência das MNPs na circulação sanguínea de aproximadamente 11 horas em camundongos e 24 horas em humanos [6 e 8].

B. Parâmetros biodistributivos

A biodistribuição predominante se deu para o fígado, porém foram encontrados acúmulos significativos no pulmão e baço. Apenas no rato 2 foi encontrado acúmulo significativo de MNPs no coração e rim, isso se deu pelo fato do animal vir a óbito, devido a uma parada respiratória, pouco antes do final do experimento, o que acarretou na permanência de material magnético no sangue e conseqüentemente no coração e rins. Essa captura do composto pelo fígado pode estar relacionada ao perfil de capilares descontínuos característicos deste órgão. Em adição, não podemos descartar a ação fagocitária das células de Kupffer presentes nesse tecido e constituintes do sistema retículo endotelial. O baço também apresentou retenção de MNPs que pode ser resultante do escape deste composto pelos capilares descontínuos assim como pode ser resultante da ação

fagocitária de células do sistema retículo endotelial presentes neste órgão. Já no pulmão, o acúmulo encontrado pode ser explicado pelo tamanho reduzido dos capilares pulmonares, onde pode existir dificuldade de passagem das MNPs e conseqüente acúmulo.

Os dados de biodistribuição obtidos foram semelhantes a dados encontrados na literatura, em experimentos que utilizam tipos diferentes de MNPs das que foram utilizadas neste trabalho, por exemplo nanopartículas de óxido de ferro mono-disperso revestidas com sílica [9] ou revestidas com dextran [8]. Apesar das nanopartículas apresentarem características que variam conforme se altera o material do núcleo, o revestimento e a solução em que estão dispersas, sempre foram documentados grandes acúmulos no fígado pulmão e baço. Entretanto não necessariamente a literatura documenta o nível de retenção na ordem apresentada neste trabalho: fígado, pulmão e baço. Esta diferença pode ter ocorrido pelo tipo de análise empregada para avaliar este parâmetro, já que neste trabalho foram utilizados os sinais da BAC absolutos obtidos dos órgãos inteiros, o que traz informações sobre a porção total do órgão e quantidades absolutas de material retido, enquanto em trabalhos anteriores foram feitas análises histológicas utilizando metodologias como microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser [8 e 9].

Conclusão

Conclui-se, então, que as MNPs utilizadas neste trabalho ($MnFe_2O_4$ – estabilizadas com citrato) tem uma meia vida na circulação de aproximadamente 181,0 segundos, o que torna viável a sua utilização como contraste em estudos fisiológicos onde o marcador, ou traçador, necessite de características como tamanho reduzido, dinamicidade e tempo de meia vida eficiente. MNPs semelhantes já são utilizadas como contraste na área de ressonância magnética e se mostraram como um contraste seguro, bem tolerado e com bons resultados, sendo eliminados da circulação após certo período de tempo [6-9]. Também foi concluído que o sistema BAC é capaz de detectar pequenos volumes de MNPs perfundidas em órgãos e tecidos, fazendo um paralelo com a instrumentação encontrada na área de medicina nuclear, porém sem o uso de radiação ionizante e com um menor custo. O perfil de biodistribuição mostrou maior retenção de ferrita em fígado, pulmão e baço, respectivamente.

Os resultados obtidos até o presente momento motivam ensaios adicionais que busquem MNPs que apresentem maior tempo de retenção na corrente sanguínea. Dentro deste contexto, este trabalho se mostra relevante, uma vez que há, ainda, uma grande quantidade de tipos de MNPs, disponíveis na literatura, a serem testadas, além de órgãos a serem perfundidos e monitorados. Em adição, as avaliações realizadas ainda podem ser aprimoradas utilizando técnicas como análises histológicas e microscopia eletrônica visando melhor investigação do padrão de biodistribuição.

Referências

- [1] Andreis U, Americo M F, Cora L A, Oliveira R B, Baffa O & Miranda J R (2008) Gastric motility evaluated by electrogastrography and alternating current biosusceptometry in dogs. *Physiol Meas*, 29: 1023-31.
- [2] Americo M F, Oliveira R B, Romeiro F G, Baffa O, Cora L A & Miranda J R (2007) Scintigraphic validation of AC Biosusceptometry to study the gastric motor activity and the intragastric distribution of food in humans. *Neurogastroenterol Motil*, 19: 804-11.
- [3] Quini C C, Americo M F, Cora L A, Calabresi M F, Alvarez M, Oliveira R B & Miranda J R (2012) Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. *J Biol Eng*, 6: 6.
- [4] Bakuzis A F, Morais P C, Pelegrini F (1999) Surface and exchange anisotropy fields in MnFe[sub 2]O[sub 4] nanoparticles: Size and temperature effects. *Journal of Applied Physics* 85:7480.
- [5] Goodwill P W, Scott G C, Stang P P & Conolly S M (2009) Narrowband magnetic particle imaging. *IEEE Trans Med Imaging*, 28:1231-7.
- [6] Nunes AD, Ramalho LS, Souza AP, Mendes EP, Colugnati DB, Zufelato N, Sousa MH, BakuzisAF, Castro CH. Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects. *Int. J. Nanomedicine*. 2014; 9:3299-312. doi: 10.2147/IJN.S64254.
- [7] 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) Vol.37:167-177
- [8] Wunderbaldinger P, Josephson L, Weissleder. R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2002;13:264–268.
- [9] Kong, S. D., Lee, J., Ramachandran, S., Eliceiri, B. P., Shubayev, V. I., Lal, R., Jin, S. Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood-brain barrier. *J Control Release* (2012). 164:49-57.