UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto
Departamento de Física

Jeam Haroldo Oliveira Barbosa

Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua
correlação com mapas quantitativos de
Ressonância Magnética

Ribeirão Preto – SP

2017

JEAM HAROLDO OLIVEIRA BARBOSA	Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua correlação com mapas quantitativos de Ressonância Magnética		DOUTORADO FFCLRP/USP 2017
--	---	--	--

JEAM HAROLDO OLIVEIRA BARBOSA

**Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua correlação com
mapas quantitativos de Ressonância Magnética**

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Carlos Ernesto Garrido Salmon.

Versão corrigida

Versão original disponível na FFCLRP - USP

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Jeam Haroldo Oliveira

Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua correlação com mapas quantitativos de Ressonância Magnética. Ribeirão Preto, 2017.

125 f. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Salmon, Carlos Ernesto Garrido.

Versão Corrigida, versão original disponível na Unidade

1. Ressonância Magnética. 2. Cérebro. 3. Íons paramagnéticos. 4. Susceptibilidade. 5. Relaxometria. 6. Ferro.

Nome: Barbosa, Jeam Haroldo Oliveira

Título: Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua correlação com mapas quantitativos de Ressonância Magnética

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha noiva Thamiris, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Agradecimento

Ao Prof. Dr. Carlos Garrido, agradeço por ter me orientado como aluno de mestrado e agora como doutorado. Agradeço todos os ensinamentos prestados e a paciência, para que durante o doutorado eu pudesse aprender o máximo do conhecimento a minha volta. Agradeço por ter confiado e permitido explorar as fronteiras do conhecimento.

Ao Prof. Dr. Baffa, agradeço pela imensa atenção e discussão referente aos resultados de ressonância paramagnética eletrônica e de todos os outros que envolveram essa tese, incluindo o meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa, agradeço pela realização e discussão referente aos experimentos de espectrometria de massa.

Ao Prof. Dr. Edson Amaro, ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz e aos pesquisadores Maria Otaduy, Rafael Emídio, Ana Tereza e Camila Nascimento e demais alunos do grupo envolvido da Faculdade de Medicina – USP, agradeço pela colaboração em aquisições de imagens *postmortem ex situ* e principalmente *in situ*, com os cortes de encéfalos e as respectivas discussões geradas. A colaboração de cada um de vocês foi muito válida para o desenvolvimento desta tese.

Ao pesquisador Dr. Paulo Loureiro, agradeço a supervisão e a oportunidade de realizar o doutorado sanduíche em Strasbourg – França. Agradeço também aos pesquisadores Dr. Patrick Poulet e Imen Miladi pelos experimentos realizados com camundongos.

Aos alunos do laboratório Inbrain, muito obrigado! Sem vocês não seria tão prazeroso fazer ciência. Vocês acreditaram em mim e me apoiaram em tudo. Obrigado por poder dividir com vocês momentos de alegria e aflição durante este momento importante da minha vida. Em especial também agradeço aos alunos Felipe Barreto e Carlo Rondinoni pela experiência de vida e científica transmitida em diversas etapas do meu desenvolvimento.

Aos meus amigos da república Moita, em especial a Antônio Carlos da Silva, Gustavo Abrão, Gustavo Pamplona, Mário Luiz Ribeiro e Silvio Bernardes, agradeço por me apoiarem. Adorava contar sobre os resultados obtidos desta tese, vocês sempre me ouviam e me deixava mais motivado para os próximos experimentos.

Aos meus pais Luiz Carlos e Elizabeth, agradeço por terem me concedido o dom da vida e todo o cuidado que tiveram comigo até esta etapa de minha vida. Obrigado por me ouvirem sempre com toda paciência e amor. Desejo muita saúde para vocês.

A minha amada Thamiris, agradeço o apoio, compreensão, paciência e por ter esperado eu estudar em muitos dias a noite e nos finais de semana.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Física – FFCLRP-USP, agradeço por sempre estarem presentes para resolver minhas dúvidas e práticas experimentais. Em especial ao Técnico Lourenço Rocha que sempre foi um técnico conselheiro e companheiro de muitos experimentos. Sérgio, Aziane, e Carlos Renato pela ajuda técnica no desenvolvimento de diversas peças para o dispositivo de correção e aquisição *ex situ*. Ao técnico Carlos Brunello, também sou eternamente grato pelas discussões que tivemos em relação a parte experimental de ressonância paramagnética eletrônica.

Ao programa de Física Aplicada a Medicina e Biologia, à FFCLRP e à USP, agradeço pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À instituição financeira SANTANDER, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche em Strasburgo - França.

Em especial, ao meu pai do céu. Agradeço à Deus pela vida de cada pessoa acima. Agradeço a saúde que foi meu principal combustível para a conclusão deste trabalho e de mais um sonho.

Resumo

Barbosa, J. H. O. **Conteúdo de íons paramagnéticos no cérebro e sua correlação com mapas quantitativos de Ressonância Magnética**. 2017. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

Mapas quantitativos de ressonância magnética (RM) têm sido propostos para quantificar a concentração *in vivo* de ferro no cérebro. Contudo, a especificidade destes mapas para outros metais e seus respectivos íons metálicos é pouco conhecida, limitando o diagnóstico radiológico e o estudo de doenças relacionadas com acúmulo de metais no cérebro. Propomos nesta tese avaliar a sensibilidade e a especificidade dos mapas de relaxometria (R_2 , R_2^*) e de susceptibilidade (QSM, sigla em inglês de *Quantitative Susceptibility Mapping*) para diferentes metais e respectivos íons paramagnéticos de encéfalos *postmortem* sem doença neurológica em duas condições (*in situ* e *ex situ*). Adicionalmente procuramos identificar as metaloproteínas associadas aos íons paramagnéticos detectados nos tecidos cerebrais. Por último, avaliamos a sensibilidade destes mapas quantitativos em estudos de biodistribuição de nano partículas superparamagnéticas de óxido de ferro em tecido animal e em objeto simulador. Treze sujeitos *postmortem* sem doença neurológica, 1 paciente *postmortem* com doença de Parkinson e 6 camundongos brancos swiss (2 controles e 4 injetados) foram estudados. Um idoso saudável também foi examinado para comparações *in vivo* e *postmortem*. Mapas de ressonância magnética de encéfalo de humanos e de corpo inteiro de animais foram adquiridos em um equipamento de 3T e 7T, respectivamente. Amostras de tecido cerebral dos núcleos da base e do lobo parietal de ambos hemisférios foram extraídas dos encéfalos humanos após, em média, 148 dias de fixação em solução de formaldeído 4%. A quantificação de íons paramagnéticos e de metais totais foi realizada por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, sigla em inglês de *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), respectivamente. Os espectros de RPE de todas as regiões cerebrais estudadas apresentaram 4 conjunto de picos principais de ressonância de diferentes amplitudes.

A simulação para os espectros obtidos de RPE permitiu identificar íons de Fe^{+3} nucleados e isolados em ferritina ($g = 2,0$ e $g = 4,28$, respectivamente) e Cu^{+2} ($g_{\parallel} = 2,259$ e $g_{\perp} = 2,062$) em ceruloplasmina desnaturada. Mapas de QSM, $R2^*$ e $R2$ de cérebro controle de *postmortem in situ* e *ex situ* foram sensíveis e específicos apenas para a concentração de ferro total e de íons paramagnéticos Fe^{+3} , como nanopartículas nucleadas na forma de ferrihidrita na ferritina. Embora cobre presente em ceruloplasmina tenha sido detectado por RPE e ICP-MS, não foi observada correlação com os mapas quantitativos de ressonância magnética. Nossos resultados *postmortem* confirmam a hipótese teórica de que os valores dos mapas QSM, $R2^*$ e $R2$, nessa ordem, estão mais fortemente correlacionados com o Fe^{+3} depositado na proteína ferritina. Os mapas de RM *in situ* foram mais sensíveis para quantificar metais do que os mapas *ex situ*, possivelmente pelo efeito do processo de fixação, permitindo uma melhor extrapolação dos resultados *in situ* para a condição *in vivo*. Nossos achados sugerem uma heterogeneidade nestas variações de sensibilidade, indicando que as técnicas de RM são dependentes da composição do tecido e devem ser levadas em conta para futuras conclusões. Por último, o mapa de susceptibilidade magnética mostrou ser mais independente da biodistribuição de nano partículas superparamagnéticas de óxido de ferro do que o mapa $R2^*$ para tecido animal e objeto simulador.

Palavras-chave: 1. Ressonância Magnética. 2. Cérebro 3. Íons paramagnéticos 4. Susceptibilidade. 5. Relaxometria. 6. Ferro.

Abstract

Barbosa, J. H. O. **Paramagnetic ion content in the brain and its correlation with Magnetic Resonance quantitative maps**. 2017. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

Quantitative magnetic resonance imaging maps have been proposed to quantify the *in vivo* concentration of iron in the brain. However, the specificity of these maps for other metals and their respective metal ions is little known, limiting the radiological diagnosis and the study of diseases related to accumulation of metals in the brain. In this work, we propose to evaluate the sensitivity and specificity of the relaxometry (R_2 and R_2^*) and susceptibility maps for different metals and respective paramagnetic ions of *postmortem* controls in two conditions (*in situ* and *ex situ*). In addition, we sought to identify the metalloproteins associated with paramagnetic ions detected in brain tissues. Finally, we evaluated the sensitivity of these quantitative maps in studies of biodistribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mice. Thirteen *postmortem* controls, 1 *postmortem* patient with Parkinson's disease and 6 white swiss mice (2 controls and 4 injected) were studied. One healthy elderly man was also examined for *in vivo* and *postmortem* comparisons. Magnetic resonance maps of human brain and whole body animals were acquired in a 3T and 7T scanners, respectively. Brain human tissues samples were extracted from the basal nucleus and parietal lobe of both hemispheres after, in averaging, 148 days of fixation in 4% formaldehyde solution. Paramagnetic ion and total metal quantification were performed by electron paramagnetic resonance and inductively coupled plasma mass spectrometry, respectively. The electron paramagnetic resonance spectra of all brain regions studied showed 4 set of major resonance peaks with different amplitudes. Simulations of the spectra obtained from electron paramagnetic resonance allowed the identification of nucleated Fe^{3+} ions isolated in ferritin ($g = 2.0$ and $g = 4.28$, respectively) and Cu^{2+} ($g_{\parallel} = 2,259$ and $g_{\perp} = 2,062$) in denatured ceruloplasmin. QSM, R_2^* and R_2 maps of *postmortem* controls *in situ* and *ex situ* were sensitivity and specific only for the concentration of total iron and Fe^{3+} as nanoparticles nucleated in the form of ferrite inside of ferritin. Although copper present in ceruloplasmin was detected by electron paramagnetic resonance and mass spectrometry, no correlation was observed with

the quantitative magnetic resonance maps. Our postmortem results confirm the theoretical hypothesis that the values of the QSM, R2* and R2 maps, in that order, are more strongly correlated with the Fe³⁺ deposited in the ferritin protein. The *in situ* magnetic resonance maps were more sensitive to quantify metals than the *ex situ* maps, allowing a better extrapolation of the *in situ* results to the *in vivo* condition. Our findings suggest heterogeneity in these sensitivity variations, indicating that magnetic resonance techniques are dependent on tissue composition and should be taken into account for future conclusions. Finally, the magnetic susceptibility map showed to be more independent of the biodistribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in animal tissue and in the simulator than the R2* map.

Keywords: 1. Magnetic Resonance. 2. Brain. 3. Paramagnetic Ions. 4. Susceptibility 5. Relaxometry. 6. Iron.

Lista de Figuras

Figura 1: Foto anatômica à esquerda e ilustração à direita dos núcleos da base e mesencéfalo em orientação coronal: 1- cabeça do núcleo caudado, 2- putâmen, 3- globo pálido, 4- tálamo, 5- núcleo rubro e 6- substância negra. Imagem adaptada de Mai et al., (2008).	2
Figura 2: Acúmulo de ferro com o avanço da idade em regiões cerebrais. (A) Gráfico da região do globo pálido adaptado de Hallgren e Sourander (1958). (B) Gráfico da região da substância negra adaptado de Zecca et al. (2001).	4
Figura 3: Representação ilustrativa de proteínas envolvidas no armazenamento de ferro: A) Ferritina na forma de holoferitina, indicado o núcleo que armazena o ferro como um complexo de hidróxido de óxido de ferro (ferrihidrita). B) Ferritina na forma de apoferritina ilustrada com proteínas H e L. Figuras adaptada de Carneiro (2001).	5
Figura 4: Representação do processo de nucleação na proteína ferritina. Imagem adaptada de Lewin, Moore e Le Brun (2005).	6
Figura 5: Defasagem entre os spins e decréscimo da magnetização macroscópica resultante (M). Sequência superior mostra uma rotação de 90° de um conjunto de spins na direção transversal (plano do eixo y), possuindo o j-esimo spin um momento magnetico μ_j . A precessão dos spins individuais no plano x-y segue imediatamente. A sequência da linha inferior mostra o mesmo processo em termos da magnetização líquida resultante, que diminui em magnitude durante a precessão por causa da perda de coerência de fase entre os spins. Imagem adaptada de Haacke et al. (2014).	12
Figura 6: Diagrama de pulsos da sequência Eco de Gradiente. Figura adaptada de Tofts (2003).	14
Figura 7: Diagrama da evolução da fase dos spins durante uma sequência de Eco de Gradiente. Um pulso $\pi/2$ gira os spins, em torno do eixo x' , para o plano transversal, onde começa a perda de coerência de fase. Os spins acumulam uma fase em determinado tempo, e logo depois é invertido o sentido do gradiente de campo, recuperando parcialmente a fase e gerando um eco. Imagem alterada de Haacke et al. (2014).	14
Figura 8: Diagrama da sequência Eco de Spin. Figura adaptada de Tofts (2003). ...	16
Figura 9: Diagrama da evolução da fase dos spins em uma sequência Eco de Spin no referencial girante. Um pulso $\pi/2$ gira os spins, em torno do eixo x' , para o plano transversal, onde começam o movimento de precessão. Os spins acumulam uma fase	

em determinado tempo, e logo depois a fase é invertida pelo pulso π . Os spins continuam a acumular fase na mesma velocidade e, mais tarde, todos os spins retornam em fase ou juntos para o eixo y' positivo, formando um eco. Figura adaptada de Haacke et al. (2014).	16
Figura 10: Representação do efeito do íon de ferro paramagnético na distorção do campo magnético local. Imagem reproduzida de Barbosa (2013).	18
Figura 11: Obtenção de imagens de magnitude e fase do sinal complexo de RM de uma sequência de Eco de Gradiente. As siglas Im e Re indicam canal imaginário e real, respectivamente.	20
Figura 12: Representação das etapas de processamento do mapa de susceptibilidade.	22
Figura 13: Diagrama do experimento de ICP-MS. Imagem adaptada de Linge e Jarvis (2009).	28
Figura 14: Diagrama do filtro de massa de tipo quadrupolar usado no equipamento de ICP-MS. Imagem adaptada de Linge e Jarvis (2009).	29
Figura 15: Representação gráfica do princípio físico da técnica RPE para um elétron livre. Desdobramento dos níveis energéticos para diferentes campos magnéticos (linha superior), forma de linha de absorção para campo de micro-ondas (linha média) e sua derivada (linha inferior).	31
Figura 16: Espectro de RPE de amostra cerebral de paciente com doença de Wilson, seca com acetona e medida em temperatura ambiente (A) refere-se aos pico de Cu^{+2} , (B) ao pico de Fe^{+3} , (C) ao pico de radical livre orgânico e (D) ao pico do padrão DDPH. As linhas de RPE do radical livre e do padrão DPPH ficaram sobrepostas. Imagem reproduzida de Wender et al., (1974).	33
Figura 17: Fotografias do encéfalo fixado do sujeito 9 (Masculino, 64 anos) e seus respectivos cortes coronais. As linhas azuis nas fotos à esquerda indicam as posições dos cortes realizados no encéfalo. Alguns alfinetes de aço inox foram utilizados para servir como referência.	39
Figura 18: Espectro de RPE subtraído do sinal de fundo e obtido em baixa temperatura com auxílio de nitrogênio líquido de amostra fixada do globo pálido esquerdo do sujeito 10. Os picos de ressonância indicados pelas setas foram identificados em espectros simulados.	47
Figura 19: Espectros de RPE para diversas condições experimentais.	48

Figura 20: Espectros de RPE simulados e adquiridos da amostra liofilizada do globo pálido do hemisfério esquerdo do sujeito 13 em temperatura ambiente. Os picos de ressonância são identificados em espectros simulados isolados.....	49
Figura 21: Espectros de RPE em temperatura ambiente. Sinal de fundo obtido com tubo sem (A) e com amostra de tecido cerebral (B). Sinal (B) com subtração do sinal (C).	50
Figura 22: Espectros de RPE normalizados e com subtração do sinal de fundo para diferentes sujeitos e regiões. Substância negra (SN), globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC), tálamo (THA), substância branca (SB) e as letras E e D que seguem são referentes ao lado esquerdo e direito.	50
Figura 23: Razão da amplitude dos picos do espectro de RPE da ferritina versus a concentração de ferro determinado por ICP-MS. A linha pontilhada no gráfico esquerdo indica os valores da ferritina isolada do cavalo. Amostras cerebrais foram do sujeito 9 (vermelho), 10 (preto) e 13 (azul). Globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC) e tálamo (THA).	52
Figura 24: Razão da amplitude dos picos do espectro de RPE da ceruloplasmina versus a concentração de cobre total determinada por ICP-MS. A linha pontilhada no gráfico esquerdo indica os valores da ferritina isolada do cavalo. Amostras cerebrais foram do sujeito 9 (vermelho), 10 (preto) e 13 (azul). Globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC) e tálamo (THA).	53
Figura 25: Correlação entre amplitude pico a pico da linha $g = 2,0$ (Fe^{+3}) e concentração total de ferro. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais dos sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◀), globo pálido (■), putâmen (▶), núcleo caudado (◆) e tálamo (●).	54
Figura 26: Espectros de RPE de amostras cerebrais do sujeito 8 na condição não fixada, fixada por 18 e 39 dias. Espectros ruidosos são de amostras que tinham pouca massa.	55
Figura 27: Foto do objeto simulador formado por cinco balões cilíndricos de látex preenchidos com SPIONs em concentração de 1,4 $\mu gFe/ml$ (amarelo), 2,8 $\mu gFe/ml$ (roxo), 5,6 $\mu gFe/ml$ (azul), 11,2 $\mu gFe/ml$ (vermelho) e somente com água (verde). .	58
Figura 28: Processamento do objeto simulador com solução de ferritina. (A) imagem de fase ajustada e desenrolada, (B) mapa de campo magnético de fundo usando ajustado por polinomial de superfície (5^a ordem) para a região de água no objeto	

simulador, (C) mapa de campo magnético de fundo extrapolado para toda a imagem, (D) Mapa QSM do objeto simulador.	62
Figura 29: Exemplo de segmentação de algumas regiões de interesse para o sujeito 13 (58 anos). Imagem de uma fatia de 1 cm de espessura do cérebro fixado na orientação coronal (esquerda), imagem T1w (centro) e mapa QSM (direita). As cores são referenciadas às regiões segmentadas: globo pálido esquerdo (vermelho escuro), putâmen esquerdo (vermelho claro), globo pálido direito (marrom), putâmen direito (laranja), núcleo caudado esquerdo (verde escuro) núcleo caudado direito (verde claro). (E) indica o lado esquerdo na orientação do paciente e (D) o direito.	64
Figura 30: Dispositivo para cortes de encéfalo corregistrados automaticamente com imagens de RM. (A) Imagem de dispositivo e encéfalo simulados com as reais dimensões. Imagens em diferentes orientações do dispositivo simulado (B-D) e foto do mesmo montado (C&E).	65
Figura 31: Seleção de cortes para reconstrução de imagem ponderada em T1 de um encéfalo fixado.	66
Figura 32: Foto de encéfalo fixado e cortado no dispositivo de corte corregistrado com imagem de RM.	66
Figura 33: Mapa de R2, R2* and QSM para o sujeito postmortem 13 (cérebro in situ e ex situ) e sujeito in vivo.	69
Figura 34: Valores de susceptibilidade versus valores de R2* para um cérebro postmortem in situ e ex situ (A). Correlações entre ambas as condições para: Susceptibilidade (B), R2* (C) e R2 (D). Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais dos sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◄), globo pálido (■), putâmen (►), núcleo caudado (◆) e tálamo (●).	70
Figura 35: Correlação dos valores de susceptibilidade relativa (A), R2* (B) e R2 (C) com a amplitude pico a pico dos picos de RPE de $g = 2,0$ (Fe^{+3}) para cérebro de postmortem in situ (preenchido) e ex situ (fixed) (vazio). A equação linear e o coeficiente de correlação foram inseridos em cada gráfico. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais do sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◄), globo pálido (■), putâmen (►), núcleo caudado (◆) e tálamo (●).	71

Figura 36: Regressão linear entre os valores de QSM, $R2^*$ e $R2$ de cérebro postmortem in situ (preenchido) e ex situ (fixed) (vazio) com a concentração de ferro medido por ICP-MS. A equação linear e o coeficiente de correlação foram inseridos em cada gráfico. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais do sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◄), globo pálido (■), putâmen (►), núcleo caudado (◆), tálamo (●) e soluções de ferritina do objeto simulador (▼).	73
Figura 37: Valores de relaxometria e susceptibilidade de diferentes concentrações de ferro presentes em solução de ferritina e água. (A) valores de $R2^*$ e $R2$ correlacionados com a concentração de ferro. (B) mapa de susceptibilidade do objeto simulador com diferentes concentrações de ferritina em água.	75
Figura 38: Valores de relaxometria e susceptibilidade de diferentes concentrações de ferro presentes em solução de SPIONs e água. (A) valores de $R1$ e $R2^*$ correlacionados com a concentração de ferro medida por ICP-AOS. (B) mapa de susceptibilidade do objeto simulador com diferentes concentrações de SPIONs.	76
Figura 39: Mapas de QSM do fígado (em ppm) sobrepostos em imagens de magnitude da sequência de Eco de Gradiente para diferentes animais.	76
Figura 40: Valores de susceptibilidade relativa (A) e $R2^*$ (B) versus valor da concentração de ferro de solução de ferritina do objeto simulador e do fígado de animais. Os valores de ambos os eixos relativos aos valores do objeto simulador foram multiplicados por dez para melhor visualização no gráfico A. As equações lineares e os coeficientes de correlação quadrática foram inseridos no gráfico.	77
Figura 41: Corregistro automático entre imagens ponderadas em T1 ex situ e fotos de cortes do encéfalo em orientação coronal dos sujeitos postmortem 5-7.	78
Figura 42: Corregistro automático entre imagens ponderadas em T1 in vivo (2 meses antes da morte), ex situ (fixado 8 meses depois da morte) e fotos de cortes do encéfalo em orientação coronal do sujeito postmortem 7 (Tabela 6).	79
Figura 43: Continuação da Figura 42.	80

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais reportes da literatura sobre a conteúdo total de ferro por unidade de peso de tecido úmido em regiões cerebrais de sujeitos saudáveis. Os valores em negrito resumem o intervalo dos achados para cada região dos núcleos da base	3
Tabela 2: Principais reportes da literatura sobre a concentração de metais no cérebro de sujeitos sem doença neurológica (controle) e pacientes com doença de Alzheimer	9
Tabela 3: Principais reportes da literatura sobre concentração de metais no cérebro de sujeitos sem doença neurológica (controle) e pacientes com doença de Parkinson	10
Tabela 4: Valores de susceptibilidade para diferentes componentes do corpo e regiões cerebrais classificadas em diamagnéticas e paramagnéticas	19
Tabela 5: Principais reportes na literatura sobre os íons paramagnéticos quantificados em tecidos humanos e metaloproteínas usando a técnica de RPE.....	33
Tabela 6: Principais características dos sujeitos postmortem envolvidos neste estudo	38
Tabela 7: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (Fe) medida por ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E).....	43
Tabela 8: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (Cu) medida por ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E).....	44
Tabela 9: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (Zn) medida por ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E).....	45
Tabela 10: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (Al) medida por ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E).....	46

Tabela 11: Valores médio (desvio padrão da média) de parâmetros simulados de espectros de RPE para as regiões dos núcleos da base e lobo parietal obtidos em temperatura ambiente para os picos de Fe^{+3} de $g = 2,0$ e $g = 4,28$	51
Tabela 12: Valores médio e desvio padrão da média de parâmetros simulados de espectros de RPE para as regiões dos núcleos da base e lobo parietal obtidos em temperatura ambiente para os picos de Cu^{+2}	52
Tabela 13: Parâmetros de sequências de aquisição de imagens	60
Tabela 14: Valores do coeficiente da regressão linear múltipla entre valor de susceptibilidade in situ e concentração dos seguintes metais: Zn, Al, Cu e Fe.....	72
Tabela 15: Valores do coeficiente da regressão linear múltipla entre valor de R^2 * ex situ e concentração dos seguintes metais: Zn, Al, Cu e Fe.....	72

Lista de Abreviaturas

AAS	sigla em inglês de <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
Al	Alumínio
AS	sigla em inglês de <i>Atomic Absorption</i>
BW	sigla em inglês de <i>Bandwidth</i>
Cu	Cobre
Cu ⁺²	Íon cúprico
CNAAN	sigla em inglês de <i>Cyclic Neutron Activation Analysis</i>
Fe	Ferro
Fe ⁺²	Íon Ferroso
Fe ⁺³	Íon Férrico
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
HCFM	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GP	Globo Pálido
ICP-AES	sigla em inglês de <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	sigla em inglês de <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	sigla em inglês de <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
Im	Canal Imaginário
INAA	sigla em inglês de <i>Instrumental Neutron Activation Analysis</i>
ISMRM	sigla em inglês de <i>International Society for Magnetic Resonance in Medicine</i>

<i>MEDI</i>	sigla em inglês de <i>Morphology Enable Dipole Inversion</i>
<i>NAA</i>	sigla em inglês de <i>Neutron Activation Analysis</i>
NC	Núcleo Caudado
NR	Núcleo Rubro
<i>PDF</i>	sigla em inglês de <i>Projection Dipole Filter</i>
PUT	Putâmen
<i>QSM</i>	sigla em inglês de <i>Quantitative Susceptibility Mapping</i>
Re	Canal Real
RF	Radiofrequência
RM	Ressonância Magnética
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SN	Substância Negra
SB	Substância Branca
SC	Substância Cinzenta
<i>SPIONs</i>	sigla em inglês de <i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>
TE	Tempo ao Eco
TF	Transformada de Fourier
TF ⁻¹	Transformada Inversa de Fourier
THA	Tálamo
T1	Relaxação Longitudinal
T2*	Relaxação Transversal
USP	Universidade de São Paulo
Zn	Zinco
Zn ⁺²	Íon de zinco

Lista de Símbolos

$\vec{M}$	Magnetização macroscópica
M_0	Magnetização macroscópica inicial
$\vec{\mu}_j$	Momento magnético de j-esimo spin
$\vec{M}_\perp(t)$	Componente transversal da magnetização no tempo t
$\vec{M}_\perp(0)$	Componente transversal da magnetização no tempo t = 0
Δt	Intervalo de tempo
χ	Susceptibilidade magnética
$\Delta\chi$	Valores relativos de susceptibilidade
$\vec{H}$	Campo magnético aplicado
$\vec{B}$	Campo magnético local
$\vec{B}_0$	Campo magnético externo aplicado
$\vec{B}_{\text{int}}$	Vetor indução magnética representando os campos internos
$\vec{A}_{\text{int}}$	Potencial vetor magnético
$\Delta B_{\text{externo}}$	Componente de campo gerada por fonte externa
ΔB_{macro}	Componente de campo gerada por inomogeneidade macroscópica
ΔB_{micro}	Componente de campo gerada por inomogeneidade microscópicas
$F\chi$	Mapa de campo simulado
δ	Mapa de campo filtrado
V	Voltagem de corrente continua
$V\cos(wt)$	Potencial de corrente alternada
m/z	Razão massa/carga

$\vec{\mu}$	Momento magnético total
$\vec{S}_i$	Momento magnético do spin eletrônico
$\vec{S}_j$	Momento magnético de outro elétron desemparelhado
$\vec{I}$	Momento magnético do núcleo
$\vec{A}$	Tensor de interação hiperfina
$\vec{D}$	Tensor de configuração da rede cristalina
$\vec{J}$	Momento angular total
$\vec{g}$	Tensor de interação Zeeman característico do elétron
$\vec{L}$	Momento angular orbital do elétron
$\vec{S}$	Momento angular do spin eletrônico
β	Constante magneton de Bohr
I	Spin nuclear
D e E	Constantes referentes à distribuição da rede cristalina
A	Interação hiperfina
$R2, R2^*$	Taxas de relaxação transversal

Sumário

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Abreviaturas	xviii
Lista de Símbolos	xx
Sumário	xxii
1 Metais no cérebro humano	1
1.1 Ferro	1
1.2 Outros metais	6
1.3 Efeitos deletérios do acúmulo de metais no cérebro	8
2 Técnicas de quantificação de metais e íons paramagnéticos em tecidos	11
2.1 Mapas quantitativos de ressonância magnética	11
2.1.1 Mapeamento por Relaxometria Transversal	11
2.1.2 Mapeamento por Susceptibilidade Magnética	18
2.2 Espectrometria de massa	27
2.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica	30
3 Justificativa e Objetivos	35
4 Metais totais e íons paramagnéticos em tecidos cerebrais	37
4.1 Metodologia	37
4.1.1 Amostras cerebrais	37
4.1.2 Solução de Ferritina	39
4.1.3 Experimentos de ICP-MS	40

4.1.3 Experimentos de RPE	40
4.2 Resultados e Discussões	42
4.2.1 Metais totais	42
4.2.2 Íons Paramagnéticos	46
4.3 Conclusão	55
5 Quantificação por Ressonância Magnética	57
5.1 Metodologia.....	57
5.1.1 Sujeitos postmortem	57
5.1.2 Preparação de animais	57
5.1.3 Objetos simuladores	58
5.1.4 Aquisição de imagens de RM.....	59
5.1.5 Processamento dos mapas quantitativos de RM	61
5.1.6 Corregistro de imagens	63
5.1.7 Análise Estatística	66
5.2 Resultados e Discussão.....	67
5.2.1 Sujeitos	67
5.2.2 Objetos simuladores	74
5.2.3 Modelo animal.....	76
5.2.4 Dispositivo de corregistro automático	77
5.3 Conclusão	81
6 Conclusões, Limitações e Perspectivas Futuras	83
Referências	87
Apêndice	97

Capítulo 1

1 Metais no cérebro humano

Os metais são cada vez mais reconhecidos por desempenhar um papel significativo na biologia celular (LIPPARD; BERG, 1994; SILVA; WILLIAMS, 2001). Muitos processos metabólicos necessitam da presença de metais, principalmente em estado iônico, por exemplo: zinco (Zn^{+2}), cobre (Cu^{+2}) e ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}). Estes íons possuem a habilidade de oxidar e reduzir, tornando-os indispensáveis para a síntese de proteínas, troca de elétrons e de oxigênio nas respectivas metaloproteínas, por exemplo: citocromos, a enzima catalase e a hemoglobina (ANDREWS, 1999). No envelhecimento saudável, em várias áreas do cérebro humano ocorre um aumento da concentração de diversos metais, tais como ferro, cobre, alumínio e zinco (HALLGREN; SOURANDER, 1958; ZATTA, 2003). No entanto, altas concentrações de Fe^{+2} e Cu^{+2} pode induzir o aumento da produção de espécies reativas (OH^*) que, por sua vez, podem levar a morte celular (NÚÑEZ et al., 2012). Descrevemos a seguir, a distribuição dos principais metais não alcalinos no cérebro humano ao longo da idade e sua relação com prevalentes doenças neurodegenerativas. O ferro assume papel de destaque por possuir principalmente uma alta concentração, ampla distribuição e funcionalidade.

1.1 Ferro

A distribuição regional de ferro no cérebro foi primeiramente demonstrada pela técnica histoquímica Perl's Stain (SPATZ, 1922). Em um trabalho pioneiro utilizando esta técnica, Spatz (1992) demonstrou *in vitro* uma intensa mancha de ferro não heme em partes do sistema extrapiramidal, menos intensa no córtex cerebral e nenhuma reação na substância branca. Posteriormente, outros trabalhos empregando diversas técnicas quantificaram a concentração de ferro entre 10,0 e 240,0 $\mu\text{gFe/g}$ de peso úmido em diferentes regiões cerebrais (DRAYER et al., 1986a; HALLGREN; SOURANDER, 1958; KREBS et al., 2014; MARKESBERY et al., 1984; SAIKI et al., 2013) e o identificaram como um metal muito abundante neste órgão (BEARD; CONNOR; JONES, 1993). A quantidade de ferro em todo o cérebro é

aproximadamente 60 mg (BARBOSA, 2013), sendo esta quantia muito menor que a observada para o fígado (1000 mg) (ANDREWS, 1999). Como apresentado na Tabela 1, a distribuição do ferro é, sem dúvidas, bastante heterogênea. Regiões dos núcleos da base (Figura 1) como núcleo rubro ($195 \pm 56 \mu\text{g}$ de Fe/g de peso úmido), substância negra ($185 \pm 65 \mu\text{g}$ de Fe/g de peso úmido) e globo pálido ($213 \pm 35 \mu\text{g}$ de Fe/g de peso úmido) têm concentrações semelhantes à de um fígado com acúmulo de ferro (150-200 μg de Fe/g de peso úmido) (BROOKS et al., 1989; CHEN; HARDY, 1993; GRIFFITHS et al., 1999; HALLGREN; SOURANDER, 1958; KREBS et al., 2014; LANGKAMMER et al., 2010; SOFIC et al., 1991).

Figura 1: Foto anatômica à esquerda e ilustração à direita dos núcleos da base e mesencéfalo em orientação coronal: 1- cabeça do núcleo caudado, 2- putâmen, 3- globo pálido, 4- tálamo, 5- núcleo rubro e 6- substância negra. Imagem adaptada de Mai et al., (2008).

Tabela 1: Principais reportes da literatura sobre a conteúdo total de ferro por unidade de peso de tecido úmido em regiões cerebrais de sujeitos saudáveis. Os valores em negrito resumem o intervalo dos achados para cada região dos núcleos da base

Região Anatômica	µg de Fe total/g de tecido úmido	Método de Quantificação Usado*	Referência
Substância cinzenta			
Globo pálido	213,0	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Globo pálido	175,3	AAS	(CHEN et al., 1989)
Globo pálido	182,0	AAS	(CHEN; HARDY, 1993)
Globo pálido	207,0	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Globo pálido	205,0	ICP-AES	(LANGKAMMER et al., 2010)
Globo pálido	169,0	NAA	(MARKESBERY et al., 1984)
Globo pálido	169-213		
Substância negra	185,0	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Substância negra	139,8	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Substância negra	84,0	Colorimetria	(THOMAS et al., 1993)
Substância negra	175,0	NAA	(ZECCA et al., 2001)
Substância negra	85-185		
Substância negra ZC+ZR	157,0	AS	(SOFIC et al., 1991)
Substância negra ZC	63,0	AS	(SOFIC et al., 1991)
Substância negra ZR	94,0	AS	(SOFIC et al., 1991)
Putâmen	130,0	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Putâmen	110,0	AAS	(CHEN; HARDY, 1993)
Putâmen	119,8	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Putâmen	78,0	Colorimetria	(THOMAS et al., 1993)
Putâmen	153,0	ICP-AES	(LANGKAMMER et al., 2010)
Putâmen	136,0	NAA	(MARKESBERY et al., 1984)
Putâmen	78-136		
Núcleo caudado	93,0	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Núcleo caudado	115,6	NAA	(BROOKS et al., 1989)
Núcleo caudado	92,5	AAS	(CHEN et al., 1989)
Núcleo caudado	117,4	ICP	Dexter et al. (1991)
Núcleo caudado	99,6	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Núcleo caudado	56,0	Colorimetria	(THOMAS et al., 1993)
Núcleo caudado	92,0	ICP-AES	(LANGKAMMER et al., 2010)
Núcleo caudado	56-117.4		
Núcleo Rubro	194,8	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Córtex Motor	50,3	Colorimetria	(HALLGREN; SOURANDER, 1958)
Córtex Frontal	41,8	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Córtex Frontal	48,0	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Córtex Parietal	30,0	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Córtex Temporal	50,1	AS	(GRIFFITHS et al., 1999)
Córtex Temporal	46,0	ICP-AES	(LANGKAMMER et al., 2010)

Tabela modificada de Haacke *et al.*, (2005). AAS: do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*; ICP-AES: do inglês *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*; NAA: do inglês *Neutron Activation Analysis*; AS: do inglês *Atomic Absorption*;

No envelhecimento saudável estas quantidades podem apresentar variações. Hallgren and Sourander (1958) observaram que a concentração de ferro aumenta com a idade e se mantém constante para indivíduos acima de 55 anos nas seguintes regiões cerebrais: globo pálido (Figura 2-A), núcleo caudado, putâmen, substância branca frontal, córtex cerebelar, córtex pré-frontal, córtex temporal, córtex sensorial, córtex parietal, córtex occipital e córtex motor. Outras regiões cerebrais como a substância negra, núcleo rubro e núcleo denteado não apresentaram dependência com a idade segundo os autores (HALLGREN; SOURANDER, 1958). Contudo, Zecca et al. (2001) encontrou correlação da concentração de ferro na substância negra com a idade (Figura 2-B); reportando um aumento até a quarta década de vida e constante até os 90 anos (ZECCA et al., 2001). Portanto, a concentração de ferro nas regiões cerebrais de sujeitos saudáveis acima de 55 anos pode ser considerada constante e não influenciar a quantificação de ferro *in vivo* de um grupo de sujeitos.

Figura 2: Acúmulo de ferro com o avanço da idade em regiões cerebrais. (A) Gráfico da região do globo pálido adaptado de Hallgren e Sourander (1958). (B) Gráfico da região da substância negra adaptado de Zecca *et al.* (2001).

No cérebro, o ferro encontra-se principalmente em células oligodendrócitos, células endoteliais de capilares e neurônios gigantes piramidais do córtex motor (SPATZ, 1922). De acordo com Connor e colaboradores (2001), células oligodendrócitos ricas em ferro são comuns na substância branca e são responsáveis pela produção de mielina, sendo estas também encontradas em núcleos da base.

Em uma dimensão molecular, a maioria do ferro no cérebro está presente nas proteínas hemoglobina, transferrina, e especialmente ferritina (SCHENCK, 1996), estas com a função principal de ligação com oxigênio, transporte de ferro e armazenamento, respectivamente. O ferro também se encontra em proteínas com

agrupamentos de ferro-enzimas com a função de transporte de elétrons (LILL; MÜHLENHOFF, 2006; ROUAULT; TONG, 2005), na hidroxilase tirosina, na reductase ribonucleotídica e em outras proteínas em menores concentrações (CRICHTON, 2002). Por último, a concentração de íon de ferro livre no cérebro em meio aquoso e pH fisiológico é muito baixa ($[\text{Fe}^{+3}] < 10^{-17}\text{M}$ e $[\text{Fe}^{+2}] < 10^{-7}\text{M}$) (SCHENCK, 2003).

Em detalhes descrevemos a proteína ferritina, por conter a maioria do ferro não heme no cérebro. A ferritina é uma molécula proteica, principalmente intracelular, que captura íons Fe^{+2} e os armazena como Fe^{+3} na molécula ferrihidrita (Figura 3-A). A ferritina livre, sem estar combinada com ferro, é chamada de apoferritina (Figura 3-B), sendo um heteropolímero de 24 subunidades que forma uma concha oca com diâmetro externo de 12-13 nm e diâmetro interno de 7-8 nm, peso molecular de aproximadamente 500 kD e com capacidade de armazenar até 4500 átomos de Fe^{+3} por molécula (HARRISON, 1996). Esta molécula é composta de canais ou subunidades H e L. A subunidade H tem atividade ferroxidase necessária para a entrada do ferro na apoferritina. A subunidade L facilita a formação do núcleo de ferro na ferritina (CHASTEEN; HARRISON, 1999).

Figura 3: Representação ilustrativa de proteínas envolvidas no armazenamento de ferro: A) Ferritina na forma de holo-ferritina, indicado o núcleo que armazena o ferro como um complexo de hidróxido de óxido de ferro (ferrihidrita). B) Ferritina na forma de apo-ferritina ilustrada com proteínas H e L. Figuras adaptada de Carneiro (2001).

O processo de armazenamento ou oxidação do ferro ocorre por meio de uma reação de hidrólise (Figura 4). Esse processo ocorre seguindo as etapas: (i) transporte de Fe^{+2} para dentro da ferritina por meio de uma tripla camada de canais hidrofílicos; (ii) oxidação de ferro ferroso por meio de sítios de ferroxidase situados dentro da subcamada H, produzindo água ou H_2O_2 ; (iii) migração de Fe^{+3} do sítio de ferroxidase

para sítios de nucleação no interior da superfície da subcamada L, que facilita a mineralização; (iv) crescimento do núcleo mineral ferrihidrita via oxidação do ferro e mineralização na superfície de crescimento do cristal (CHASTEEN; HARRISON, 1999). Uma vez ocorrido a nucleação, a proteína mantém o crescimento do núcleo de ferrihidrita (Figura 4) até ficar totalmente cheia de acordo com a disponibilidade de Fe^{+2} do meio, armazenando assim o ferro insolúvel (Fe^{+3}) em uma forma solúvel em água (CRICHTON, 2002). Assim, a ferritina pode estar parcialmente ou totalmente cheia de átomos de ferro nos tecidos cerebrais (LEWIN; MOORE; LE BRUN, 2005). A saída de átomos de ferro pode ocorrer pela degradação da ferritina por lisossomos e proteossoma (ZHANG et al., 2010). A biodistribuição da nucleação de ferro na ferritina para tecidos cerebrais é pouco descrita na literatura, possivelmente por não ter uma técnica apropriada para sua quantificação.

Figura 4: Representação do processo de nucleação na proteína ferritina. Imagem adaptada de Lewin, Moore e Le Brun (2005).

1.2 Outros metais

A concentração de cobre no cérebro humano se encontra no intervalo de 2,9 a 10,7 $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (LUTSENKO; BHATTACHARJEE; HUBBARD, 2010). A distribuição deste metal no cérebro é heterogênea, sendo as regiões com maiores concentrações o hipocampo, a substância negra, o núcleo denteado, o núcleo caudado e as regiões cerebelares (TANDON et al., 1994; VÖLKL; BERLET; ULE, 1974; ZATTA, 2003). Volkl et al. (1974) reportou a concentração de cobre na substância negra aumentou até os 40 anos. O cobre é um cofator essencial de um número grande de enzimas importantes (SCHEIBER; DRINGEN, 2013) que estão envolvidos em reações redox (KAIM; RALL, 1996; RUBINO; FRANZ, 2012). Por

exemplo, citocromo c oxidase (metabolismo energético), superóxido dismutase contendo Cu (antioxidante), ceruloplasmina (metabolismo do ferro), dopamina- β -monooxigenase (síntese de neurotransmissores) e enzima peptidilglicina- α -midação (síntese de neuropeptídeos) (SCHEIBER; MERCER; DRINGEN, 2014).

A concentração de zinco para diversas regiões do cérebro humano se encontra na faixa de 10,0 a 18,0 $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (ANDRÁSI et al., 1999; SAIKI et al., 2013). As regiões com maior concentração de zinco são: hipocampo, amígdala e núcleo caudado (ANDRÁSI et al., 1999; EHMANN; MARKSBERY; ALAUDDIN, 1984; KORNHUBER et al., 1994; MARKESBERY et al., 1984). A concentração de zinco é significativamente maior em adultos do que em crianças. Além disso, determinadas regiões cerebrais apresentam correlação positiva entre a concentração de zinco e a idade (EHMANN; MARKSBERY; ALAUDDIN, 1984; HEBBRECHT; MAENHAUT; REUCK, 1999; SAITO K, 1994). Destaca-se que entre a quarta e sétima década de vida, os valores da concentração de zinco se mantêm constante (ULE; VÖLKL; BERLET, 1974). O Zn^{+2} está presente no cérebro dentro de vesículas sinápticas nos terminais glutamatérgicos e sua função está relacionada à sinapse, mas pouco ainda é conhecido sobre o principal papel deste metal. Também está ligado a metaloproteínas e mobilizado intracelularmente após estresse oxidativo (SENSI et al., 2011).

A concentração de alumínio (Al) em regiões cerebrais se encontra no intervalo de 0,02 e 5,12 $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (ROIDER; DRASCH, 1999; YASUI; KIHARA; OTA, 1992). O alumínio foi encontrado nas seguintes regiões cerebrais em ordem crescente de concentração: cápsula interna, substância branca cerebelar, putâmen, núcleo caudado, tálamo, hipocampo, giro superior temporal, giro médio temporal, giro pós-central, giro pré-central, núcleo rubro, substância negra e globo pálido (ZATTA, 2003). Estudos demonstraram uma correlação positiva entre a concentração de alumínio e a idade até as últimas décadas de vida (EHMANN; MARKESBERY, 1982; MARKESBERY et al., 1984; MCDERMOTT et al., 1979). O aumento da concentração de Al com a idade, pode resultar em um acúmulo gradual do ambiente com o tempo, pois este metal está presente em tratamento municipal de água, embalagens de bebidas e comidas, e utensílios domésticos (MARKESBERY et al., 1984). Segundo Verstraeten, Aimo e Oteiza (2008) nenhuma função biológica foi atribuída ao alumínio, pelo contrário, o acúmulo de Al nos tecidos e órgãos resulta na sua disfunção e

toxicidade, efeitos que normalmente se correlacionam com a concentração local do metal (VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008).

1.3 Efeitos deletérios do acúmulo de metais no cérebro

Estudos com *postmortem* de décadas passadas, reportaram um aumento significativo da concentração de metais em cadáveres com doenças neurodegenerativas (Tabela 2 e 3). O aumento da concentração de metais e principalmente de íons paramagnéticos de forma livre no citoplasma e que não podem ser controlados pelas metaloproteínas, como ferritina e ceruloplasmina, pode gerar radicais livres por meio da reação de Fenton (Equação 1 e 2) (RIEDERER; YODIM, 1993). Nesta reação, os metais de transição Fe^{+2} e Cu^{+1} reagem com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerando radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e metais oxidados:

A seguir, apresentamos a concentração de metal (Al, Fe, Zn e Cu) e a respectiva região quantificada em estudos com cadáveres de sujeitos sem doença neurológica e pacientes com duas doenças de alta incidência: doença de Alzheimer (Tabela 2) e doença de Parkinson (Tabela 3). As tabelas abaixo indicam um aumento de metal para algumas regiões cerebrais dos pacientes e em outras regiões um decréscimo do mesmo metal ou de outro metal. Para a variação da concentração de dois metais diferentes para a mesma ou outra região cerebral, interpretamos como uma possível relação de causa e consequência para um metal em função do outro. As divergências entre os resultados reportados para um mesmo metal, podem estar relacionadas ao erro técnico e experimental. No entanto, na literatura consultada (CRICHTON; DEXTER; WARD, 2011; FERNANDEZ; BARBOSA; SCHRODER, M. V., 2007), não existe um consenso entre a relação causa-efeito do acúmulo de ferro e outros íons paramagnéticos em relação às doenças neurodegenerativas. Além disso, não está definido se há alteração da concentração de metais ao longo da progressão da doença. A quantificação *in vivo* de metais ou íons metálicos por imagens de Ressonância Magnética (doravante RM) possibilita a realização de estudos longitudinais, visando entender a relação entre eles e a progressão de doenças em seres humanos.

Tabela 2: Principais reportes da literatura sobre a concentração de metais no cérebro de sujeitos sem doença neurológica (controle) e pacientes com doença de Alzheimer

Região cerebral	Metal	Sujeito	µg/g de peso seco (erro ou desvio)	Técnica	Número de sujeitos, gênero	Faixa etária (anos)	Referência
Hipocampo	Alumínio	Controle	1,43(-)	CNAA	30, 15H	52-69	(WARD; MASON, 1987)
		Alzheimer	11,5(-)*		28, 18H	52-72	
Lóbulo parietal inferior	Alumínio	Controle	1,7(0,4)	AAS	10	57-93	(XU, 1992)
		Alzheimer	3,8(0,8)*		10	52-85	
Hipocampo	Ferro	Controle	216,0(16,0)	INAA	11, 3H	~81,7	(DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996)
		Alzheimer	288,0(20,0)*		10, 7H	~80,4	
Hipocampo	Ferro	Controle	52,0(3,0)w	INAA	21, 6H	69-98	(CORNETT; MARKESBERY; EHMANN, 1998)
		Alzheimer	61,4(2,1)w*		58, 31H	59-98	
Hipocampo	Ferro	Controle	49,8(7,8)w	ICP-MS	12, 8H	63-89	(CORRIGAN; REYNOLDS; WARD, 1993)
		Alzheimer	39,8(11,9)w*		12, 2H	65-93	
Hipocampo	Cobre	Controle	16,8(0,9)	INAA	11, 3H	~81,7	(DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996)
		Alzheimer	12,6(1,2)*		10, 7H	~80,4	
Hipocampo	Zinco	Controle	67,6(-)	CNAA	30, 15H	52-69	(WARD; MASON, 1987)
		Alzheimer	52,7(-)*		28, 18H	52-72	
Hipocampo	Zinco	Controle	72,0(4,8)	INAA	11, 3H	~81,7	(DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996)
		Alzheimer	85,1(4,7)*		10, 7H	~80,4	
Hipocampo	Zinco	Controle	12,8(3,3)w	ICP-MS	12, 8H	63-89	(CORRIGAN; REYNOLDS; WARD, 1993)
		Alzheimer	8,1(2,9) w*		12, 2H	65-93	
Hipocampo	Zinco	Controle	15,2(1,0)w	INAA	21, 6H	69-98	(CORNETT; MARKESBERY; EHMANN, 1998)
		Alzheimer	18,0(0,6)w*		58, 31H	59-98	
Lóbulo parietal inferior	Zinco	Controle	57,7(1,2)	INAA	11, 3H	~81,7	(DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996)
		Alzheimer	62,0(2,0)*		10, 7H	~80,4	

*(p<0,05), w: peso fresco. ICP-MS: do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*; INAA: do inglês *instrumental Neutron Activation Analysis*; CNAA: do inglês *Cyclic Neutron Activation Analysis*; AAS: do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*

Tabela 3: Principais reportes da literatura sobre concentração de metais no cérebro de sujeitos sem doença neurológica (controle) e pacientes com doença de Parkinson

Região cerebral	Metal	Sujeito	µg/g de peso seco (erro ou desvio)	Técnica	Número de sujeitos, gênero	Faixa etária (anos)	Referência
Substância negra	Alumínio	Controle	25,1(0,8)	INAA	5, 2H	65-75	(YASUI; KIHIRA; OTA, 1992)
		Parkinson	33,9(3,1)*		4, 3H	70-78	
Globo pálido	Alumínio	Controle	16,9(2,4)	INAA	5, 2H	65-75	(YASUI; KIHIRA; OTA, 1992)
		Parkinson	33,6(7,3)*		4, 3H	70-78	
Núcleo caudado	Alumínio	Controle	20,6(2,2)	INAA	5, 2H	65-75	(YASUI; KIHIRA; OTA, 1992)
		Parkinson	31,5(3,1)*		4, 3H	70-78	
Substância negra	Ferro	Controle	48(8,2)w	ESPECTROF.	8, 4H	51-91	(SOFIC et al., 1988)
		Parkinson	85(11,1)w*		8, 4H	66-86	
Substância negra	Ferro	Controle	121,8(12,6)w	ICP	9	--	(DEXTER et al., 1989)
		Parkinson	163,8(12,6)w*		7	--	
Substância negra	Ferro	Controle	139,8(13,1)w	ESPECTROF.	6, 2H	83,3	(GRIFFITHS et al., 1999)
		Parkinson	280,9(21,6)w*		6, 2H	83,6	
Substância negra ZC	Ferro	Controle	62(7)	ESPECTROF.	9	--	(SOFIC et al., 1991)
		Parkinson	89(9,0)*		7	68-80	
Substância negra	Ferro	Controle	155,4(12,6)w	ICP	3	--	(DEXTER et al., 1989)
		Parkinson	201,6(12,6)w*		8	--	
Globo pálido (lat)	Ferro	Controle	207,0(9,7)w	ESPECTROF.	6, 2H	83,3	(GRIFFITHS et al., 1999)
		Parkinson	295,0(12,5)w*		6, 2H	83,6	
Substância negra ZC	Cobre	Controle	44,8(6,8)*	ICP	3	--	(DEXTER et al., 1991)
		Parkinson	24,4(4,7)		8	--	
Substância negra	Cobre	Controle	38,8(3,3)*	ICP-OES	12, 8H	~70	(UITTI et al., 1989)
		Parkinson	29,3(2,7)		9, 6H	~73	
Substância negra	Zinco	Controle	62,5(4,6)	ICP	9	--	(DEXTER et al., 1987, 1991)
		Parkinson	93,8(13,7)*		7	--	
Substância negra ZC	Zinco	Controle	61,7(4,5)	ICP	3	--	(DEXTER et al., 1991)
		Parkinson	95,2(13,1)*		8	--	
Núcleo caudado	Zinco	Controle	79,9(3,6)	ICP	23	--	(DEXTER et al., 1991)
		Parkinson	107,9(10,5)*		22	--	
Putâmen lateral	Zinco	Controle	65,5(3,4)	ICP	14	--	(DEXTER et al., 1991)
		Parkinson	77,4(2,3)*		11	--	

*(p<0,05), w: peso fresco. *(p<0,05), ICP: do inglês *Inductively Coupled Plasma*; ESPECTROF.: do inglês *Absorption Apectrophotometry*. ICP-OES: do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

Capítulo 2

2 Técnicas de quantificação de metais e íons paramagnéticos em tecidos

Neste capítulo abordamos os mapas quantitativos de RM, os métodos de quantificação de metais por espectrometria de massa com *ICP-MS* e de RPE. Destes métodos serão descritos os princípios físicos de funcionamento, metodologia de medida e vantagens para a utilização.

2.1 Mapas quantitativos de ressonância magnética

Os mapas quantitativos de RM são gerados por processamento computacional das imagens adquiridas no aparelho de RM. Em resumo, as imagens por RM são adquiridas por meio do fenômeno físico de Ressonância Magnética Nuclear envolvendo as etapas de: Magnetização inicial, Excitação, Relaxação e Recepção do sinal de RM. Adicionalmente, para gerar a imagem, é realizado uma codificação espacial do objeto por meio de gradientes de campo magnético aplicados nas três últimas etapas mencionadas. Maiores detalhes das etapas do processo de formação das imagens por RM não são expostos nessa tese e podem ser consultadas nas seguintes teses do nosso grupo de pesquisa (BARBOSA, 2013; MAZIERO, 2016). Diferentemente das imagens tradicionais, os mapas de RM fornecem a distribuição espacial dos valores quantitativos de determinadas propriedades físicas do tecido. Dentre eles, os mais estudados para quantificação *in vivo* da concentração de metais e íons paramagnéticos são os mapas de relaxometria transversal (R_2 e R_2^*) e susceptibilidade (HAACKE et al., 2005) que serão descritos em detalhes neste capítulo.

2.1.1 Mapeamento por Relaxometria Transversal

O mapa de relaxometria transversal apresenta o valor da taxa de relaxação da magnetização transversal do tecido contido em cada voxel. A magnetização transversal de um voxel é definida como uma magnetização macroscópica resultante

da soma dos momentos magnéticos individuais de cada spin em uma dimensão microscópica. A taxa de relaxação da magnetização é uma propriedade intrínseca dos tecidos e descreve o quão rápido a componente macroscópica da magnetização transversal diminui após ser excitada por um pulso de campo magnético aplicado na frequência de Larmor (Figura 5). A relaxação transversal é dominada pela interação magnética spin-spin e também é influenciada pela interação spin-rede via processo não secular (TOFTS, 2003). Segundo Tofts (2003), a interação spin-spin ocorre quando há variações no somatório da componente paralela do campo magnético de fundo e de B_0 , que resultam em flutuações locais na frequência de Larmor. Logo, a coerência de fase é perdida e a componente transversal da magnetização decai (Figura 5). A interação spin-rede ocorre devido à sobreposição da componente perpendicular do campo de fundo, oscilatória, e que causa uma redução no tempo de vida do estado do spin, sendo modelado pela mecânica quântica (TOFTS, 2003).

Figura 5: Defasagem entre os spins e decréscimo da magnetização macroscópica resultante ($\vec{M}$). Sequência superior mostra uma rotação de 90° de um conjunto de spins na direção transversal (plano do eixo y), possuindo o j-esimo spin um momento magnético $\vec{\mu}_j$. A precessão dos spins individuais no plano x-y segue imediatamente. A sequência da linha inferior mostra o mesmo processo em termos da magnetização líquida resultante, que diminui em magnitude durante a precessão por causa da perda de coerência de fase entre os spins. Imagem adaptada de Haacke *et al.* (2014).

O fenômeno de relaxação transversal pode ser macroscopicamente descrito pela solução das equações empíricas de Bloch (HAACKE *et al.*, 2014). Tomando a

solução da componente transversal da magnetização, considerando o referencial girante, vamos ter uma evolução temporal na forma de uma exponencial decrescente:

$$\vec{M}_{\perp}(t) = \vec{M}_{\perp}(0)e^{-t \cdot R2^*} \quad (3)$$

Em que $\vec{M}_{\perp}(t)$ e $\vec{M}_{\perp}(0)$ são a componente transversal da magnetização no tempo t e $t = 0$, respectivamente. O referencial girante de coordenadas representa uma referência que gira solidário com a magnetização precessionando em torno ao eixo z com a frequência de Larmor. $R2^*$ representa a taxa de relaxação da componente transversal da magnetização, que é proporcional às características do tecido como distribuição do conteúdo de água, gordura e íons paramagnéticos, e também as inomogeneidades de campo magnético gerados pelo equipamento, pelo tecido e pela influência do movimento browniano.

Relaxometria $R2^*$

A taxa de relaxometria $R2^*$ é obtida através da sequência de aquisição de imagens Eco de Gradiente com diferentes tempos ao eco. A sequência Eco de Gradiente é baseada na aplicação de um único pulso de radiofrequência para a excitação do sistema de spins, um gradiente de preparação e outro de leitura com amplitudes opostas (Figura 6). A evolução da magnetização durante uma sequência Eco de Gradiente típica é descrita na Figura 7: O pulso de RF rotaciona o sistema de spins, em torno do eixo x' até o plano transversal caso seja um pulso de 90° aplicado por x' , dando início à perda de coerência de fase devido aos diversos mecanismos de relaxação transversal. Neste contexto, fase representa o ângulo de um spin ou grupo de spins em relação ao um eixo de referência, eixo x' por exemplo. Inicialmente os grupos de spins estão com máxima coerência de fase. Adicionalmente, os grupos de spins, dependendo da sua posição espacial, acumulam uma fase individual durante um intervalo de tempo Δt na presença do gradiente de campo magnético local e de um aplicado, e logo depois a coerência de fase é parcialmente recuperada pela aplicação de outro gradiente de campo magnético oposto no mesmo intervalo Δt . Acontecendo um máximo de coerência ou o eco no tempo TE , conhecido como tempo ao eco. Esta recuperação parcial é caracterizada pela função exponencial descrita na Equação 3.

Figura 6: Diagrama de pulsos da sequência Eco de Gradiente. Figura adaptada de Tofts (2003).

Figura 7: Diagrama da evolução da fase dos spins durante uma sequência de Eco de Gradiente. Um pulso $\pi/2$ gira os spins, em torno do eixo x' , para o plano transversal, onde começa a perda de coerência de fase. Os spins acumulam uma fase em determinado tempo, e logo depois é invertido o sentido do gradiente de campo, recuperando parcialmente a fase e gerando um eco. Imagem alterada de Haacke *et al.* (2014).

A aquisição das imagens usando a sequência Eco de Gradiente é mais simples e rápida do que a Eco de Spin, por não utilizar um pulso de radiofrequência para inverter a fase do sistema de spins. Para calcular a taxa de relaxação $R2^*$, é necessário adquirir a sequência de Eco de Gradiente para diferentes tempos ao eco

em modo único ou múltiplo. A aquisição em modo múltiplo da sequência Eco de Gradiente é geralmente mais conveniente (JENSEN, 2011), porque reduz o tempo de aquisição e contém boa relação sinal ruído. No entanto, o sinal obtido é muito dependente da homogeneidade do campo B_0 e de gradientes macroscópicos de campo magnético gerado por interfaces com grandes variações de susceptibilidade, por exemplo, entre tecido e ar (WOOD; GHUGRE, 2008). Esses gradientes geram um decaimento de sinal multi-exponencial e resulta em vários valores de $R2^*$. O efeito pode ser reduzido com a diminuição do tamanho do voxel e a correção da inomogeneidade do campo magnético B_0 usando bobinas de *shimming* de alta ordem. Porém, a redução do voxel pode causar diminuição da relação sinal/ruído e gerar menor acurácia no ajuste do decaimento do sinal (JENSEN, 2011). Desta forma, na aquisição há um compromisso que deve ser estabelecido entre sinal e ruído suficiente para uma boa acurácia e tamanho de voxel para não conter inomogeneidades espúrias.

Relaxometria $R2$

O método mais comum para realizar o mapeamento de $R2$, é através da sequência de aquisição de imagens Eco de Spin com diferentes TE. A sequência Eco de Spin é baseada na aplicação de dois pulsos de radiofrequência (RF) (Figura 8). A evolução da magnetização durante uma sequência Eco de Spin típica é descrita na Figura 9, a saber: um pulso $\pi/2$ gira os spins e assim a magnetização macroscópica inicial (M_0) em torno do eixo x' para o plano transversal semelhante ao início da sequência Eco de Gradiente, dando início à perda de coerência de fase devido aos diversos mecanismos de relaxação transversal. No decorrer do tempo, cada grupo de spins acumula uma fase individual no intervalo de tempo Δt . Um pulso de inversão (pulso π) é aplicado invertendo a fase acumulada até esse instante e estes grupos de spins continuam a acumular fase na mesma velocidade, porém partindo de uma fase inicial invertida. Após um período Δt , os spins retomam parcialmente a coerência de fase no eixo y' positivo, formando um eco devido à sobreposição coerente deles. A magnetização inicial não é recuperada totalmente porque as velocidades de precessão antes e depois do pulso π não são exatamente as mesmas devido às flutuações do campo magnético de fundo. Esta recuperação parcial é caracterizada pela exponencial da Equação 3, em que $R2^*$ deve ser substituído por $R2$.

Figura 8: Diagrama da sequência Eco de Spin. Figura adaptada de Tofts (2003).

Figura 9: Diagrama da evolução da fase dos spins em uma sequência Eco de Spin no referencial girante. Um pulso $\pi/2$ gira os spins, em torno do eixo x' , para o plano transversal, onde começam o movimento de precessão. Os spins acumulam uma fase em determinado tempo, e logo depois a fase é invertida pelo pulso π . Os spins continuam a acumular fase na mesma velocidade e, mais tarde, todos os spins retornam em fase ou juntos para o eixo y' positivo, formando um eco. Figura adaptada de Haacke *et al.* (2014).

Na sequência Eco de Spin, o pulso de radiofrequência de inversão recupera a perda de coerência de fase dos spins afetados pela inomogeneidade de campo magnético estático que teria uma taxa de relaxação $R2'$. Apesar disso, não recupera a perda de coerência e, consequentemente, de magnetização afetada pela

inomogeneidade dinâmica, resultando em uma taxa de relaxação R_2 . Sendo a taxa de relaxação R_2^* composta por $R_2^* = R_2 + R_2'$.

A taxa de relaxação R_2 é também influenciada pelo coeficiente de difusão da água do tecido e pelo tempo do intervalo entre um eco e outro (GHUGRE et al., 2005). A aquisição dos ecos pode ser realizada usando múltiplos ecos de uma mesma magnetização transversa, ou através de várias aquisições com um único eco. A sequência que adquira um único eco é mais robusta com respeito ao efeito das imperfeições do pulso de inversão e deve ser repetida mudando o parâmetro TE. No entanto a aquisição com múltiplos ecos necessita de menos tempo. Caso a última seja utilizada, deve-se buscar minimizar o erro do pulso de inversão, através do aumento da espessura do corte de re-focalização, selecionado pelo pulso π , para três vezes mais que a espessura do corte de seleção (PELL et al., 2006).

A taxa de relaxação R_2 no tecido cerebral pode ser multi-exponencial devido à composição da amostra avaliada. O R_2 da substância branca, por exemplo, é resultante da relaxação de água extracelular e do citoplasma ($R_2 = 10 \text{ s}^{-1}$), de líquido cefalorraquidiano ($R_2 = 1 \text{ s}^{-1}$) e de água de hidratação aprisionada entre as camadas de mielina ($R_2 = 20\text{-}50 \text{ s}^{-1}$) (MACKAY et al., 1994). No valor de R_2 da substância cinzenta, não há o efeito da água aprisionada entre a mielina, mas há influência do conteúdo de metais como, principalmente, o ferro, cuja concentração é alta.

Relação entre técnicas de relaxometria e conteúdo de metais paramagnéticos

Metais paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados que geram inomogeneidades microscópicas de campo magnético. A partir disso, os spins nucleares interagem, sobretudo, de forma dipolar, causando uma mudança da sua frequência de precessão, consequentemente produzindo uma defasagem entre os spins nucleares e um aumento das taxas de relaxação R_2 ou R_2^* (Figura 10). Ressaltando o que foi escrito nos dois tópicos anteriores, o valor de R_2 seria proporcional para a concentração de íon paramagnético, onde a inomogeneidade de campo magnético criada fosse de tamanho e intensidade suficiente para ser dinamicamente observada por spins nucleares vizinhos. Como o valor de R_2^* inclui a taxa de relaxação R_2 e mais a taxa de relaxação R_2' referente ao efeito do gradiente de campo microscópico estático, logo R_2^* é esperado ser mais sensível na quantificação de metais do que R_2 . Todavia, além do depósito de metal, outras fontes

de gradiente de campo distante podem alterar o valor de $R2^*$, tornando essa medida menos específica espacialmente (GELMAN et al., 1999; HAACKE et al., 2005).

Figura 10: Representação do efeito do íon de ferro paramagnético na distorção do campo magnético local. Imagem reproduzida de Barbosa (2013).

Correlação linear significativa entre a concentração de ferro com os valores de $R2$ (VYMAZAL et al., 1996) e $R2^*$ (YAO et al., 2009), foram reportadas pela literatura para amostras de cérebros saudáveis e para valores de $R2$ e $R2^*$ medidos em encéfalos *postmortem in situ* saudáveis (LANGKAMMER et al., 2010). Contudo, a sensibilidade das taxas de relaxação *in situ* e *ex situ* para outros metais e respectivos íons paramagnéticos não foi ainda explorada. Por outro lado, a susceptibilidade magnética tem sido proposta como uma medida menos dependente do conteúdo de água do que as taxas de relaxação (HAACKE et al., 2015). No tópico a seguir, mais detalhes são apresentados sobre o mapeamento por susceptibilidade magnética.

2.1.2 Mapeamento por Susceptibilidade Magnética

A susceptibilidade magnética (χ) é definida como um valor de proporcionalidade entre a magnetização ($\vec{M}$) produzida em uma substância e a intensidade do campo magnético aplicado ($\vec{H}$). Para materiais lineares, isotrópicos e homogêneos, esta relação fica expressa como:

$$\vec{M}(\vec{r}) = \chi(\vec{r}) \cdot \vec{H}(\vec{r}) \quad (4)$$

Em outras palavras, a susceptibilidade magnética descreve quanto um tecido se magnetiza a favor ou contra um campo magnético externo aplicado. Se um material for magnetizado no sentido do campo aplicado, este é denominado como paramagnético. Materiais paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados e apresentam momento de dipolo magnético diferente de zero (SAINI et al., 1988). Se

um material apresenta magnetização líquida que pode ser detectada em sentido contrário ao campo magnético aplicado, este é denominado como diamagnético. Essa magnetização líquida é provocada por uma ligeira alteração assimétrica no movimento do orbital dos elétrons (SAINI et al., 1988). A susceptibilidade magnética é uma propriedade intrínseca de uma substância que permite caracterizar tecidos em função de suas propriedades magnéticas, nível de oxigenação de tecidos (OGAWA et al., 1990), diferenciar depósitos de ferro e calcificações (CHEN et al., 2014; DEISTUNG et al., 2013). O cérebro possui tecidos paramagnéticos e diamagnéticos conforme mostrado na Tabela 4 (SCHENCK, 1996).

Tabela 4: Valores de susceptibilidade para diferentes componentes do corpo e regiões cerebrais classificadas em diamagnéticas e paramagnéticas

Diamagnéticos	χ (ppm) < 0	Paramagnéticos	χ (ppm) > 0
Células vermelhas totalmente desoxigenadas	-6,56 ^c	Tálamo	0,04 ^b
Sangue totalmente desoxigenado (assumindo Hematócrito = 0,45)	-7,9 ^c	Núcleo caudado	0,09 ^b
Hemoglobina (oxigenada)	-9,91	Putâmen	0,10 ^b
Água (37°C)	-9,05	Núcleo rubro	0,14 ^b
Cobre	-9,6	Substância negra	0,17 ^b
Lípideos	-10,0	Globo pálido	0,19 ^b
Osso cortical	-12,82 ^c	Hemoglobina (desoxigenada)	0,20

^a Valores relativos a substância branca de Wharton and Bowtell (2010). ^b Valores obtidos de Haacke et al. (2005).

^c Valores estimados a partir de Schenck (1996).

O sinal de RM é proporcional à magnetização transversa do tecido, seja paramagnético ou diamagnético. Como explicado anteriormente, a magnetização é um vetor que possui magnitude e direção, que no caso da componente transversa é determinada pela fase em relação a um eixo de referência. Desta forma, o sinal de RM pode ser utilizado para formar uma imagem de magnitude e outra de fase (Figura 11). As imagens e os mapas quantitativos convencionais de RM são gerados pela informação de magnitude. Já a informação de susceptibilidade é extraída da imagem de fase (HAACKE et al., 2005). A imagem de fase necessária para o processamento do mapa de susceptibilidade é geralmente adquirida por sequência de múltiplos Ecos de Gradiente ponderada em tempo de relaxação longitudinal (T1) nos primeiros ecos e nos últimos ecos também é ponderada em tempo de relaxação transversal (T2*) (HAACKE; REICHENBACH, 2011). A sequência de múltiplos Ecos de Gradiente gera imagens de fase com contribuição do campo magnético não homogêneo gerado pela

própria máquina e pelo efeito da distribuição de susceptibilidades na amostra, associada essa distribuição à presença de metais ou íons paramagnéticos. Diferentemente da sequência de múltiplos Ecos de Spin que recupera a perda de coerência de fase no sinal gerada por estas contribuições estáticas.

Figura 11: Obtenção de imagens de magnitude e fase do sinal complexo de RM de uma sequência de Eco de Gradiente. As siglas Im e Re indicam canal imaginário e real, respectivamente.

O dado de fase em uma aquisição Eco de Gradiente tem sido proposto há quase 20 anos para extrair o valor de susceptibilidade magnética de um objeto de forma arbitrária em campos magnéticos de baixa intensidade (TOMASI et al., 1998). Porém, o processamento do mapa de susceptibilidade magnética do cérebro foi proposto a partir de 2005 (HAACKE et al., 2005; MARQUES; BOWTELL, 2005). Nos últimos anos, esta técnica tem-se aperfeiçoado visando uma análise quantitativa mais precisa para avaliações clínicas (DE ROCHEFORT et al., 2010; HAACKE et al., 2015; KRESSLER et al., 2010; LIU et al., 2009; SCHWESER et al., 2011b; SHMUELI et al., 2009; WANG; LIU, 2015; WHARTON; BOWTELL, 2010). A seguir, descrevemos sucintamente a dependência da fase com a susceptibilidade e a equação para extrair o seu valor. Logo em seguida, são descritas as etapas computacionais necessárias, utilizadas nessa tese, para obter o mapa de susceptibilidade. Outros métodos para o

cálculo de susceptibilidade podem ser encontrados de forma resumida na literatura (BARBOSA, 2013; WANG; LIU, 2015).

A fase do sinal de RM ($\varphi(TE, \vec{r})$) adquirido em um determinado TE e proveniente de uma determinada localização espacial ($\vec{r}$) possui dependência direta com o campo magnético local ($\vec{B}(\vec{r})$) de acordo com a equação abaixo:

$$\varphi(TE, \vec{r}) = -\gamma \cdot \vec{B}(\vec{r}) \cdot TE \quad (5)$$

Onde γ é a razão giromagnética, sendo para o núcleo de hidrogênio igual a 42,58 M Hz/T.

O campo magnético local $\vec{B}(\vec{r})$ é composto pela soma do campo magnético externo aplicado $\vec{B}_0(\vec{r})$ e a somatória dos campos internos gerados por cada momento magnético da amostra, $\vec{B}_{int}(\vec{r} - \vec{r}')$, localizados individualmente na posição $\vec{r}$.

$$\vec{B}(\vec{r}) = \vec{B}_0(\vec{r}) + \sum_i \vec{B}_{int}(\vec{r} - \vec{r}'_i) \quad (6)$$

Se considerarmos somente a contribuição dipolar dos momentos magnéticos no campo magnético interno, o $\vec{B}_{int}$ pode ser derivado do rotacional do primeiro termo da expansão multipolar do potencial vetorial magnético $\vec{A}_{int}(\vec{r} - \vec{r}')$:

$$\vec{B}_{int}(\vec{r} - \vec{r}') = \vec{\nabla} \times \vec{A}_{int}(\vec{r} - \vec{r}') \quad (7)$$

Tomando o primeiro termo da expansão multipolar de $\vec{A}_{int}$:

$$\vec{A}_{int}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\vec{M}(\vec{r}) \times (\vec{r} - \vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|^3} \quad (8)$$

Após aplicar o rotacional em um produto vetorial, resulta da Equação 7 em:

$$\vec{B}_{int}(\vec{r} - \vec{r}') = \frac{\mu_0}{4\pi r^3} \left([3 \cdot (\vec{M}(\vec{r}) \cdot (\hat{r} - \hat{r}')) \cdot (\hat{r} - \hat{r}')] - \vec{M}(\vec{r}) \right) \quad (9)$$

Sendo a magnetização $\vec{M}(\vec{r})$ descrita em função da susceptibilidade $\chi(\vec{r})$ para materiais lineares, isotrópicos e homogêneos como mostrado na Equação 4. Utilizando a equação acima e considerando a somatória dos momentos magnéticos como uma integral no volume da amostra, podemos reescrever a Equação 6 para o campo magnético local como:

$$\vec{B}(\vec{r}) = \vec{B}_0(\vec{r}) + \frac{\vec{B}_0(\vec{r})}{4\pi} \cdot \int_{V'} d^3r' \left[\frac{3\chi(\vec{r}) \cdot (\vec{r} - \vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|^5} \cdot (\vec{r} - \vec{r}') - \frac{\chi(\vec{r})}{|\vec{r} - \vec{r}'|^3} \right] \quad (10)$$

Portanto, a Equação 5 da fase pode ser escrita em função da susceptibilidade:

$$\varphi(TE, \vec{r}) = -\gamma \cdot TE \cdot \left(\vec{B}_0(\vec{r}) + \frac{\vec{B}_0(\vec{r})}{4\pi} \cdot \int_V d^3r' \left[\frac{3\chi(\vec{r}) \cdot (\vec{r} - \vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|^5} \cdot (\vec{r} - \vec{r}') - \frac{\chi(\vec{r})}{|\vec{r} - \vec{r}'|^3} \right] \right) \quad (11)$$

Tomando a susceptibilidade em evidência no segundo termo da equação acima, e aplicando neste termo o teorema da convolução da transformada de Fourier (TF) e, posteriormente, aplicando a transformada inversa de Fourier (TF⁻¹), maiores detalhes consultar a bibliografia descrita (HAACKE; REICHENBACH, 2011; MARQUES; BOWTELL, 2005; SHMUELI et al., 2009), podemos escrever a susceptibilidade como:

$$\chi(\vec{r}) = TF^{-1} \left[TF \left(\frac{\varphi(TE, \vec{r})}{-\gamma \cdot TE \cdot \vec{B}_0} \right) \cdot \left(\frac{1}{3} - \frac{k_z^2}{k^2} \right)^{-1} \right] \quad (12)$$

Seguindo a relação matemática acima, podemos aplicar um processamento computacional para que a imagem de fase resulte no mapa de susceptibilidade.

Podemos dividir, ainda, este processamento em preparação da imagem de fase e cálculo da susceptibilidade como mostrado na Figura 12.

Figura 12: Representação das etapas de processamento do mapa de susceptibilidade.

Preparação da imagem de fase:

A preparação da imagem de fase consiste, primeiramente, na aplicação de uma máscara para remover o crânio, os olhos e bolhas de ar (artefatos), deixando apenas o cérebro, por meio da imagem de magnitude. Aplica-se um ajuste linear ao longo das imagens de fase com diferentes tempos ao eco. Este ajuste determina valores de fase que somente evoluem com os tempos ao eco e remove fases induzidas por efeitos de condutividade, correntes induzidas e erros de combinação de bobinas (HAACKE et al., 2015). Realiza-se, também, o desenrolamento da imagem de fase, termo em inglês denominado *unwrapping*. A imagem de fase adquirida é limitada ao intervalo de 2π , enquanto o sinal de fase original fisicamente deve assumir valores superiores ou inferiores a 2π e -2π , respectivamente. A função *prelude* do programa FSL (Analysis Group, FMRIB, Oxford, UK) é um algoritmo computacional robusto para desenrolar a imagem de fase (SMITH, 2002). Com a imagem de fase preparada, calculamos o mapa de campo magnético por meio da divisão da imagem de fase pela razão giromagnética e o tempo ao eco. O campo magnético resultante do processamento acima, contém componentes de campos geradas tanto por fonte externa ($\Delta B_{\text{externo}}(\vec{r})$) como internas (Equação 13). A fonte de campo externo é gerada por inhomogeneidades do campo estático do equipamento. As fontes de campo internas se dividem em inhomogeneidades macroscópicas ($\Delta B_{\text{macro}}(\vec{r})$) e microscópicas ($\Delta B_{\text{micro}}(\vec{r}, TE)$). As inhomogeneidades macroscópicas são produzidas por regiões com elevada susceptibilidade (ar, osso e possíveis depósitos de metais) que perturbam o campo magnético em grandes distâncias. As inhomogeneidades microscópicas são geradas por regiões de menor susceptibilidade, a quais perturbam apenas localmente o campo magnético, incluindo regiões com moderada concentração de metal (núcleos da base). As fontes de perturbações microscópicas são variáveis no tempo para átomos de hidrogênio com movimento browniano. Dependendo do alcance do movimento dos átomos de hidrogênio, alguns podem em determinado tempo interagir com campos magnéticos microscópicos, porém em outro instante não mais.

$$\Delta B(\vec{r}) = \Delta B_{\text{externo}}(\vec{r}) + \Delta B_{\text{macro}}(\vec{r}) + \Delta B_{\text{micro}}(\vec{r}, t) \quad (13)$$

Depósitos de metais no cérebro são relacionados somente nos últimos dois termos do lado direito da Equação 13. Para um mapa de campo sensível a

concentrações de metais, é necessário remover a contribuição de campo $\Delta B_{\text{externo}}$. Imagens de fase adquiridas com sequência Eco de Spin possuem as contribuições $\Delta B_{\text{externo}}$ anuladas devido à re-focalização dos spins, logo a contribuição de campo ΔB_{macro} também é anulada. As imagens de fase adquiridas com sequência Eco de Gradiente contêm todas as contribuições de campo (Equação 13). A literatura tem sugerido diversos métodos para remover a componente $\Delta B_{\text{externo}}$ de imagens de fase de sequência Eco de Gradiente, nomeado como campo de fundo (traduzido de *background field*) (DUYN et al., 2007; HAACKE et al., 2004; NEELAVALLI et al., 2009; SCHWESER et al., 2011b; WHARTON; SCHAFER; BOWTELL, 2010). Diversos métodos de remoção de campo de fundo estão descritos na dissertação do mesmo autor dessa tese (BARBOSA, 2013).

Cálculo da susceptibilidade:

O valor de susceptibilidade magnética não pode ser determinado de forma direta, porque a Equação 12 assume valores indefinidos da divisão por zero no termo $\left(\frac{1}{3} - \frac{k_z^2}{k^2}\right)^{-1}$ em determinadas regiões do espaço inverso. Foram propostos recentemente três métodos para contornar essa indefinição: limiarização (HAACKE et al., 2010; SHMUELI et al., 2009), solução por mínimos quadrados (DE ROCHEFORT et al., 2008; LIU et al., 2011; WHARTON; BOWTELL, 2010) e múltiplas orientações (LIU et al., 2009). O uso de limiarização gera artefatos indesejáveis em toda a imagem, e a aquisição em múltiplas orientações é inviável para a rotina clínica. A solução por mínimos quadrados foi escolhida neste trabalho para calcular o mapa de susceptibilidade por resultar em menos artefatos do que o método de limiarização e não necessitar de múltiplas aquisições.

O cálculo do mapa de susceptibilidade por mínimos quadrados encontra iterativamente uma solução para o valor de susceptibilidade em que a diferença entre o mapa de campo simulado (F_{χ}) e o mapa de campo filtrado (δ) seja mínima. Pelas características de problema inverso, uma regularização da solução se torna necessária para penalizar a susceptibilidade nos voxels que não fazem parte de uma interface na imagem de magnitude (LIU et al., 2011). A regularização mais comumente usada é a regularização de Tikhonov, resultando nosso problema de otimização expresso na forma:

$$\min_{\chi} (\|W(F\chi - \delta)\|_2 + \|M\nabla_1\chi\|_2) \quad (14)$$

O primeiro termo da equação, $F\chi$, representa a convolução da matriz de χ com a função kernell $F = \left(\frac{1}{3} - \frac{k_z^2}{k^2}\right)$ no espaço real. W é uma matriz que pondera o efeito do ruído na imagem e será diagonal se consideramos um sinal de RM com ruído gaussiano não correlacionado. Esta matriz contém o inverso do desvio padrão do sinal para cada ponto. O último termo da Equação 14 refere a um fator de penalização na regularização de Tikhonov, onde é procurado suavizar os valores de susceptibilidade no mapa resultante em regiões homogêneas da imagem de magnitude. Aqui ∇ é um operador de gradiente tridimensional aplicado sobre a distribuição de susceptibilidade e M é uma matriz diagonal, onde os elementos da diagonal principal são iguais a 0 em pixels com um gradiente de intensidade elevado em uma direção específica na imagem de magnitude e iguais a 1 caso contrário.

Relação entre técnica de susceptibilidade magnética e conteúdo de metais paramagnéticos

A susceptibilidade magnética quantifica a concentração de metal paramagnético no tecido de forma indireta como a relaxometria, mas até o momento é a medida *in vivo* mais relacionada com a propriedade magnética do tecido. Alta correlação linear tem sido reportada entre valores de susceptibilidade e concentração de metais, em específico para ferro (LANGKAMMER et al., 2012; SUN et al., 2015; ZHENG et al., 2013). Um primeiro estudo que correlacionou valores *postmortem* de susceptibilidade e relaxometria com concentração de ferro medida por ICP-MS de tecido cerebral observou alto coeficiente de correlação linear para ambas as técnicas (LANGKAMMER et al., 2012). Porém, não foi encontrado quais dos valores quantitativos de RM foram os mais sensíveis para quantificar a concentração de ferro, uma vez que os erros experimentais e o fato de ser diferentes técnicas impossibilitaram a comparação direta entre eles. Zheng e colaboradores (2013) encontraram também alta correlação entre a concentração de ferro calculada nas imagens de fatias de cérebro fixadas em formol por imagem de fluorescência de Raios-X. Contudo os autores avaliaram somente susceptibilidade, impossibilitando a comparação com valores de relaxometria. Sun e colaboradores (2015) correlacionaram valores de susceptibilidade e taxa de relaxação com ferro férrico calculado por uma técnica histoquímica que, segundo os autores, é sensível somente

a ferro férrico. Porém, na literatura consultada, pouco é conhecido sobre a especificidade da técnica histoquímica utilizada pelos autores. Além disso, os resultados da correlação linear para os valores de susceptibilidade e relaxometria em relação a ferro, foram muito semelhantes (LANGKAMMER et al., 2012). Já resultados conjuntos de ambas as técnicas em pacientes com doença de acúmulo de ferro como Parkinson (BARBOSA et al., 2015; MURAKAMI et al., 2015) e Esclerose Múltipla (LANGKAMMER et al., 2013), apresentaram o mapa de susceptibilidade como o mais sensível para diferenciar *in vivo* sujeitos saudáveis e pacientes.

Mesmo de forma indireta, a susceptibilidade e a relaxometria são complementares e de extrema importância para a quantificação de ferro *in vivo*. Até onde sabemos, não há evidência experimental das características do ferro (isto é, a forma iônica e a proteína de ligação) detectada no cérebro humano por técnicas de RM. Além do mais, a pequena influência de outros metais (Cu, Zn e Al) sobre os valores de susceptibilidade e relaxometria ainda não foram quantificadas no cérebro normal. Mais estudos de *postmortem* com tecido cerebral em diferentes condições (*in vivo*, *in situ* e fixado) são necessários para melhor descrever a sensibilidade destas técnicas para quantificar ferro ou outros metais e respectivos íons paramagnéticos. Além disso, estudos em modelos animais possibilitam avaliar a sensibilidade delas em relação a biodistribuição do metal no tecido.

2.2 Espectrometria de massa

A quantificação total de metais no cérebro foi inicialmente realizada para a identificação de ferro pela técnica histoquímica no começo da década de 1920-1930 usando Perl's Stain. Posteriormente, utilizou-se diversas técnicas para quantificar em específico a concentração de ferro, como a colorimetria melhorada com outros corantes (DRAYER et al., 1986b; HALLGREN; SOURANDER, 1958; RIEDERER et al., 1989; SOFIC et al., 1991; THOMAS et al., 1993), espectroscopia por absorção atômica (RIEDERER et al., 1989), espectrofotometria de absorção (GRIFFITHS et al., 1999), análise por ativação com nêutrons (BROOKS et al., 1989; EHMANN; MARKESBERY, 1982), e *ICP-MS* (DEXTER et al., 1989; KREBS et al., 2014; LANGKAMMER et al., 2010). Neste trabalho, selecionamos a técnica *ICP-MS* para quantificar a concentração de metais nas amostras de tecido cerebral, uma vez que esta analisa diversos elementos em uma mesma varredura e chega a ser duas a três ordens de magnitude mais sensível do que a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (*ICP-OES*, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) (BEDSON, 1996). Outro fator importante para selecionarmos *ICP-MS*, foi o uso da técnica em trabalhos que correlacionaram os valores quantitativos de RM e concentração de ferro (LANGKAMMER et al., 2010, 2012), o que facilita a comparação dos resultados.

A técnica de *ICP-MS* consiste na transformação da amostra em estado atomizado ou iônico e na quantificação de uma grande variedade de elementos químicos por meio da relação carga/massa. Nela, é quantificada a concentração total de cada metal, desconsiderando o fato do mesmo estar ligado ou em determinado estado iônico. A Figura 13 mostra um diagrama do experimento de *ICP-MS*.

Figura 13: Diagrama do experimento de ICP-MS. Imagem adaptada de Linge e Jarvis (2009).

A atomização e a ionização da amostra ocorrem no plasma acoplado. O plasma é formado pela interação de um intenso campo eletromagnético produzido por radiofrequência em uma bobina de cobre e um fluxo de gás inerte visando não formar compostos estáveis em uma tocha de quartzo concêntrica, através do choque com elétrons acelerados. Nesta condição, o gás se ioniza e choques sucessivos aumentam a ionização do gás tornando o plasma auto-sustentável. A temperatura do plasma chega a 6000K (HIEFTJE; NORMAN, 1992). Neste ambiente, é inserido a amostra líquida por meio de um nebulizador e um sistema de aerosol (MORA et al., 2003). A amostra em aerossol é transportada para o plasma pelo fluxo de gás argônio e sofre vaporização, atomização e ionização. Posteriormente, o plasma acoplado direciona a amostra no espectrômetro de massa.

O espectrômetro de massa em geral focaliza os íons positivos diretamente no analisador de massas por meio de eletrodos submetidos a diferentes tensões. Fótons, elétrons e íons negativos não são analisados, pois o espectrômetro de massa é sensível somente a íons positivos. O analisador de massa mais utilizado é o quadrupolo, que possui baixo custo, funcionamento simples e pode operar com diversos íons.

O analisador de quadrupolo é formado por quatro hastes paralelas, dispostas em dois pares opostos (Figura 14), em que cada par apresenta um potencial elétrico aplicado de sinal oposto. O potencial aplicado contém uma voltagem de corrente contínua (V) e somado um potencial de corrente alternada ($V\cos(wt)$). A manipulação destas voltagens muda a trajetória central de íons específicos, portanto somente íons

com uma razão massa/carga (m/z) específica atravessam o centro do quadrupolo, enquanto outros íons são desviados. Variando as voltagens no quadrupolo se obtém o espectro de massas em toda a faixa de m/z .

Figura 14: Diagrama do filtro de massa de tipo quadrupolar usado no equipamento de *ICP-MS*. Imagem adaptada de Linge e Jarvis (2009).

Os resultados de *ICP-MS* são reportados após a conversão do sinal obtido de determinada razão carga/massa em concentração do metal por meio de curvas de calibração adquiridas para padrões analíticos. Para confirmar a sensibilidade da quantificação por *ICP-MS*, se utiliza uma amostra externa contendo diversos metais e já quantificada por um laboratório de referência. Embora o limite de detecção de *ICP-MS* seja de até 0,02, 0,1, 0,2, e 0,5 $\mu\text{g/g}$ para Cu, Zn, Al e Fe, respectivamente (BATISTA et al., 2009), este pode sofrer interferência espectral de alguma espécie iônica com razão carga/massa próxima do analito e que não possa ser separada desta (SAINT'PIERRE, 2004).

2.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica espectroscópica que quantifica a concentração de íons paramagnéticos ou radicais livres em amostras com elétrons que possuem spin resultante não nulo. O princípio físico da RPE é baseado no desdobramento energético induzido pela interação do momento magnético do elétron desemparelhado com o campo magnético (COSTA-FILHO, 1997). Os autovalores do operador Hamiltoniano são as energias (E) referentes a este desdobramento. Este operador é descrito a partir da soma das principais interações que agem sobre o elétron desemparelhado (Equação 15). O primeiro termo da soma contém a interação do momento magnético total ($\vec{\mu}$) com o campo magnético externo aplicado ($\vec{B}$), caracterizando o bem conhecido efeito Zeeman. Os outros dois últimos termos são referentes à interação do momento magnético do spin eletrônico ($\vec{S}_i$) com fontes de campo magnético interno da própria amostra, como o momento magnético do núcleo ($\vec{I}$) mais próximo ao íon paramagnético e o momento magnético de outro elétron desemparelhado ($\vec{S}_j$) (para condição de mais de um elétron livre na amostra):

$$E = \vec{\mu} \cdot \vec{B} + \vec{S}_i \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \vec{S}_i \cdot \vec{D} \cdot \vec{S}_j \quad (15)$$

Onde $\vec{A}$ e $\vec{D}$ são tensores que representam o acoplamento espacial entre as variáveis spin eletrônico $\vec{S}_i$, spin nuclear $\vec{I}$ e outro spin eletrônico $\vec{S}_j$. O momento magnético total $\vec{\mu}$ pode ser escrito em função do valor de momento angular total $\vec{J}$:

$$\vec{\mu} = \beta \cdot \vec{g} \cdot \vec{J} \quad (16)$$

Em que $\vec{g}$ é o tensor de interação Zeeman característico do elétron, também chamado de fator g , e $\vec{J}$ descreve a contribuição do momento angular orbital do elétron ($\vec{L}$) e do spin eletrônico ($\vec{S}$), isto é $\vec{g} \cdot \vec{J} = (\vec{g}_L \cdot \vec{L} + \vec{g}_S \cdot \vec{S})$, e β é a constante magneton de Bohr ($\beta = 9,27 \times 10^{-24}$ J/T).

O experimento de RPE mais simples envolve um elétron livre ($L = 0$, $S = 1/2$, $g = 2.0033$) (Figura 15). S é o autovalor m_s que pode ser $\pm$. Este possui apenas interação do spin eletrônico com o campo magnético gerado por fonte externa:

$$E = \beta \cdot \vec{g}_s \cdot \vec{S} \cdot \vec{B} \quad (17)$$

Figura 15: Representação gráfica do princípio físico da técnica RPE para um elétron livre. Desdobramento dos níveis energéticos para diferentes campos magnéticos (linha superior), forma de linha de absorção para campo de micro-ondas (linha média) e sua derivada (linha inferior).

Um elétron de uma amostra com momento magnético nuclear diferente de zero tem o campo magnético resultante diferente do elétron livre. A modificação do campo causa alterações visíveis no espectro de RPE e são chamadas de interações hiperfinas, decorrentes da interação com núcleo do próprio íon paramagnético. O spin nuclear pode assumir valores inteiros ou semi-inteiros. Assim, se o spin nuclear é I , haverá $(2I + 1)$ estados nucleares de spin possíveis. Para um spin nuclear igual a 1 serão 3 possíveis estados nucleares de spin. Como exemplo, o íon Cu^{+2} possui $S = 1/2$ e $I = 3/2$, logo terá 4 estados nucleares de spin possíveis que interagem com nosso spin eletrônico desemparelhado gerando 4 diferentes energias.

Para íons com mais de um elétron desemparelhado ($S > 1/2$) ocorre a interação entre os spins, sendo a interação de dipolo-dipolo a mais intensa. O terceiro termo da Equação 15 pode ser rescrito da seguinte forma:

$$\vec{S}_i \cdot \vec{D} \cdot \vec{S}_j = D(S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)) + E(S_x^2 + S_y^2) \quad (18)$$

Em outras palavras, D e E são constantes referentes à distribuição da rede cristalina. S_x , S_y e S_z são componentes do spin ao longo dos eixos cristalinos perpendiculares x, y e z (BOTTINO et al., 2002). A razão E/D assume valores $|E/D| \leq 1/3$ e descreve se a rede possui simetria axial ou rômica ($E/D = 1/3$). Como exemplos, a proteína hemoglobina possui simetria axial ($E = 0$) e proteínas de único agrupamento não-heme apresentam geralmente simetria rômica (COSTA FILHO, 2001).

A área abaixo da curva de absorção do espectro de RPE é proporcional à concentração de íons paramagnéticos. A amplitude pico a pico da derivada da curva de absorção (Figura 15) para espectros de largura de linha constante também é proporcional à concentração de spins desemparelhados. A largura de linha é definida como a metade da largura a meia altura de uma linha de absorção ou como a largura pico a pico da primeira derivada (CATTANI, 1995).

Para amostras que possuem mais de um íon paramagnético com linhas de ressonância sobrepostas, é necessário separar os espectros para quantificar a área ou a amplitude pico a pico individualmente. A Figura 16 apresenta um exemplo de espectro de RPE que contém vários picos de ressonância sobrepostos (indicadas como “A”, “C” e “D”), para os quais seria necessário separar as linhas do espectro. A identificação da metaloproteína contendo o respectivo íon paramagnético é por meio da simulação de espectro de RPE e comparando com os reportados pela literatura. Caso a forma de linha do espectro e os parâmetros espectrais de RPE sejam semelhantes, pode-se concluir que se trata da mesma metaloproteína. Na simulação de espectros de RPE, busca-se encontrar um sinal semelhante ao experimental por meio do cálculo da Equação 15 com parâmetros experimentais (frequência, varredura de campo magnético, temperatura, temperatura e condição física da amostra) e parâmetros intrínsecos da amostra (número quântico do spin, núcleo, constante de interação hiperfina, constante de distribuição cristalina, tipos e intensidade da largura de linha).

Figura 16: Espectro de RPE de amostra cerebral de paciente com doença de Wilson, seca com acetona e medida em temperatura ambiente (A) refere-se aos pico de Cu^{+2} , (B) ao pico de Fe^{+3} , (C) ao pico de radical livre orgânico e (D) ao pico do padrão DPPH. As linhas de RPE do radical livre e do padrão DPPH ficaram sobrepostas. Imagem reproduzida de Wender *et al.*, (1974).

A Tabela 5, na sequência, mostra os principais artigos publicados pela literatura sobre caracterização de diferentes íons paramagnéticos com experimento de RPE para tecidos cerebrais, fígado, sangue e metaloproteína isolada.

Tabela 5: Principais reportes na literatura sobre os íons paramagnéticos quantificados em tecidos humanos e metaloproteínas usando a técnica de RPE

Amostras	Íons	g	Condição experimental	Referência
Cortex cerebral, substância branca, núcleos da base e cerebelo	Fe^{+3} Cu^{+2}	4,465 $g_{\parallel} = 2.257$ e $g_{\perp} = 2.044$	Não fixado e seca em acetona, 3 controles saudáveis e 3 pacientes com doença de Wilson	(WENDER <i>et al.</i> , 1974)
SN	Fe^{+3} e Cu^{+2}	Não reportado	Não fixado, 27 Controles (18 homens, 48-81anos) e -193 °C.	(ZECCA; SWARTZ, 1993)
SN, GP, NC, SC, SB e locus coeruleus	Fe^{+3} Cu^{+2}	6 e 4 2,2	Não fixado, 1 controle (65 anos) e -193 °C.	(ZECCA <i>et al.</i> , 1996)
SN	Fe^{+3}	4,3 e 2,1-2,3	Não fixado, 9 controles e várias temperaturas.	(AIME <i>et al.</i> , 1997)
Giro temporal médio	Fe^{+3} (methemoglobina) Fe^{+3} (transferrina e ferritina) Cu^{+2}	5,8 6, 4,3 e 2 $g_{\parallel} = 2.24$ e $g_{\perp} = 2.059$	Fixado em formol, 1 controle (72 anos) e 1 paciente com doença de Alzheimer (89 anos) e -261 °C.	(KUMAR <i>et al.</i> , 2016)
Ferritina humana isolada do baço	Fe^{+3} Cu^{+2}	4,3 e 2 2	Não fixado, 1 paciente com β -talassemia e várias temperaturas.	(WEIR; PETERS; GIBSON, 1985)
Fígado	Fe^{+3} (methemoglobina) Fe^{+3} (transferrina e ferritina) Radical livre	5,8 4,3 e 2,1 2	Não fixado, liofilizada e humano.	(MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA <i>et al.</i> , 2003)
Sangue	Fe^{+3} (transferrina) Fe^{+3} (methemoglobina) Cu^{+2} (ceruloplasmina)	4,2 6,2 2,05	Não fixado, congelado, controles e pacientes com câncer melanoma e -196 °C.	(KUBIAK; KRZYMINIEWSKI; DOBOSZ, 2013)
Sangue	Fe^{+3} (transferrina) Fe^{+3} (methemoglobina) Cu^{+2} (ceruloplasmina) Radical livre	4,2 5,8 – 6,0 2,05 2,002-2,005	Não fixado, congelado, controles e pacientes com diferentes tipos de câncer e -103 °C.	(KUBIAK; KRZYMINIEWSKI; DOBOSZ, 2013)

Em geral, os experimentos com amostra humana reportados acima (Tabela 5), observaram Fe^{+3} com valor de $g \sim 6$, $g \sim 4$ e $g \sim 2$ presente nas proteínas methemoglobina, transferrina e ferritina, respectivamente. Sendo a ferritina contendo os valores de $g \sim 4$ e $g \sim 2$. Maiores amplitudes pico a pico foram observadas somente para $g \sim 2$ quando a ferritina estava mais carregada de ferro (WEIR; PETERS; GIBSON, 1985). Picos de RPE de Cu^{+2} também foram observados em amostras humanas e relacionados a proteína ceruloplasmina pela literatura (Tabela 5).

A quantificação de íons paramagnéticos por RPE de tecido cerebral agrega informações de estado de oxidação e propriedades magnéticas que outras técnicas físico-químicas (espectrofotometria, ICP-MS e outras) não permitem. Um estudo recente de Kumar e colaboradores procurou quantificar formas de ferro no tecido cerebral ex situ usando EPR (KUMAR et al., 2016).. Porém os autores apenas reportaram os principais picos observados dos espectros de EPR para tecido cerebral em baixa temperatura, mas não fizeram correlações diretas das quantificações dos mesmos com as técnicas de RM. De forma inédita, esta tese quantifica íons paramagnéticos com as informações citadas anteriormente com intuito de validar a sensibilidade das medidas quantitativas de RM.

Capítulo 3

3 Justificativa e Objetivos

Há evidências crescentes que o acúmulo de íons paramagnéticos no cérebro, principalmente de íons ferrosos, podem causar uma gama de distúrbios no sistema nervoso central (BERG et al., 2008). Estudos histoquímicos de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson e Alzheimer, têm encontrado elevadas concentrações de metais nos cérebros de pacientes (RIEDERER et al., 1989; SOFIC et al., 1991). Mapas quantitativos de ressonância magnética (R2, R2* e QSM) têm sido propostos para quantificar a concentração de ferro no cérebro *in vivo*. No entanto, a especificidade destes mapas para outros metais e seus respectivos íons metálicos é pouco conhecida, limitando o diagnóstico radiológico e o estudo de doenças relacionadas com acúmulo de metais no cérebro. Não há evidência experimental das características do ferro e a influência de outros metais (Cu, Zn e Al) sobre os valores de susceptibilidade e relaxometria de tecido cerebral. Experimentos com cérebros *postmortem* são necessários para correlacionar os mapas de RM com a concentração de metal quantificada por técnicas físico químicas. Também estudos de tecido cerebral *in situ*, dentro do cadáver, aproximaria melhor os resultados encontrados para a condição *in vivo* sem que envolva o processo de fixação. Além disso, estudos em modelos animais possibilita avaliar a sensibilidade dos mapas de RM em relação a biodistribuição do metal no tecido.

Propomos nesta tese, portanto, avaliar a sensibilidade e a especificidade dos mapas R2, R2* e QSM para diferentes metais e respectivos íons paramagnéticos de encéfalos *postmortem* sem doença neurológica em duas condições (*in situ* e *ex situ*). Esperamos que a avaliação nestas duas condições possa enriquecer nossa discussão sobre a sensibilidade dos mapas quantitativos de RM. Como outro objetivo, identificar as metaloproteínas associadas aos íons paramagnéticos detectados para os tecidos cerebrais e sua correlação com as técnicas de imagem. Por último, examinar a aplicabilidade da susceptibilidade e relaxometria em estudos de biodistribuição de nanopartículas magnéticas injetadas em camundongos.

Os próximos capítulos abordaram as metodologias, os resultados e as discussões obtidas nesta tese para alcançar os objetivos propostos. A quantificação de metais totais e íons paramagnéticos com a respectiva simulação de espectros de RPE para identificar as metaloproteínas presentes no tecido cerebral é descrita no Capítulo 4. A obtenção dos mapas quantitativos de RM de encéfalos *postmortem* sem doença neurológica em duas condições (*in situ* e *ex situ*) é reportado no Capítulo 5. Também neste último, é descrito a sensibilidade dos mapas de RM para metais e íons paramagnéticos. Por último é avaliado a biodistribuição de nanopartículas magnéticas injetadas em camundongos.

Capítulo 4

4 Metais totais e íons paramagnéticos em tecidos cerebrais

Este capítulo apresenta os resultados da quantificação de metais (Fe, Cu, Zn e Al) usando a técnica de ICPMS e íons paramagnéticos usando RPE em amostras de tecido cerebral humano e em soluções de ferritina. Adicionalmente são expostos os resultados de simulação dos espectros de RPE para separar as componentes espectrais visando a identificação dos íons paramagnéticos e das metaloproteínas associadas.

4.1 Metodologia

4.1.1 Amostras cerebrais

Os comitês de ética da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (HCFM), entidades da Universidade de São Paulo, aprovaram a realização do estudo (Apêndice A-C). O consentimento informado foi obtido a partir do parente de cada indivíduo em ambos os hospitais e realizado por equipe de enfermagem do próprio serviço.

Amostras de tecido cerebral dos núcleos da base e do lobo parietal de ambos os hemisférios foram extraídas de encéfalos fixados em solução de formaldeído 4% de 14 indivíduos (Tabela 6): Oito sujeitos (Tabela 6, sujeitos 1-8) encaminhados para autópsia no Serviço de Verificação de Óbito do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e cinco sujeitos (Tabela 6, sujeitos 9-13) do Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os encéfalos foram cortados em orientação coronal (Figura 17). As regiões cerebrais amostradas tiveram volume de 1cm³ e foram as seguintes de ambos os lados direito (D) e esquerdo (E): substância negra (SN),

globo pálido (GP), núcleo rubro (NR), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC), tálamo (THA), substâncias branca (SB) e cinzenta (SC) na região do parietal médio. Médicos patologistas de ambas as instituições examinaram os cadáveres (Tabela 6) e seus respectivos dados clínicos para assegurar o cumprimento dos seguintes critérios de inclusão: intervalo *postmortem* inferior a 18 horas, ausência de história de transtorno neurológico, nenhuma evidência externa de trauma cerebral e ausência de material ferromagnético. Adicionalmente, as regiões cerebrais mencionadas acima foram amostradas de um sujeito diagnosticado com doença de Parkinson avançada (Tabela 6, sujeito Parkinson) no HCFMRP. Mais pacientes de doença de Parkinson ou outra doença neurodegenerativa com acúmulo de metal não foram avaliados. Já que os casos foram recrutados no próprio serviço de necropsia do hospital e houve um baixo número destes pacientes com apenas doença neurodegenerativa e não com adição de outra doença, como neurovascular, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2016. O estudo com pacientes do HCFM não foi aceito pela coordenação dessa instituição por motivo de colaboração já iniciada com outro grupo de pesquisa. No total 14 sujeitos *postmortem* e 224 amostras avaliadas. A Tabela 6 descreve para cada sujeito a respectiva idade, sexo, causa da morte, tempo até a imagem de RM e tempo de fixação em solução 4% de formaldeído.

Tabela 6: Principais características dos sujeitos *postmortem* envolvidos neste estudo

Sujeitos	Idade (anos)	Sexo	Causa da Morte	Tempo até imagem de RM (horas)	Tempo de fixação (dias)
1	51	F	Pneumonia	---	120
2	51	M	Pneumonia	---	100
3	77	F	Pneumonia	---	138
4	71	M	Pneumonia	---	127
5	70	F	Cardiopatia	---	344
6	56	M	Embolia pulmonar	---	259
7	90	F	Embolia pulmonar	---	115
8	60	F	Cardiopatia	---	0
9	64	M	Cardiopatia	18	188
10	58	F	Cardiopatia	14	158
11	62	F	Cardiopatia	14	174
12	75	F	Pneumonia	12	117
13	58	M	Cardiopatia	10	97
Parkinson	76	M	Bronco aspiração	14	99

Figura 17: Fotografias do encéfalo fixado do sujeito 9 (Masculino, 64 anos) e seus respectivos cortes coronais. As linhas azuis nas fotos à esquerda indicam as posições dos cortes realizados no encéfalo. Alguns alfinetes de aço inox foram utilizados para servir como referência.

4.1.2 Solução de Ferritina

Utilizou-se uma solução de ferritina isolada de baço de cavalo (Ref. F4503, Lote SLBK7557V, Sigma-Aldrich, EUA) para adquirir espectros de RPE e quantificar ferro por *ICP-MS*. A concentração de ferritina e ferro determinada pelo fornecedor foi de 53 mg de ferritina/ml e de 6,9 mgFe/ml para a solução bruta. Considerando que a ferritina totalmente carregada possui peso molecular de 920000,0 g e 4500 átomos de ferro com massa de 55 g ou 247555 g de ferro na ferritina (SCHENCK, 1992). A partir da relação citada acima, a razão entre massa de ferritina e de ferro fornecida anteriormente estimamos 2145 átomos de átomos de ferro dentro da proteína, logo está parcialmente carregada. A solução bruta de ferritina foi diluída para 2,8, 1,4, 0,7 e 0,3 mg de ferritina/ml e em concentração de ferro de 364,5, 182,3, 91,1 e 39,1 $\mu\text{gFe/ml}$, respectivamente. As diluições de ferritina seguiram as concentrações esperadas de ferro para tecidos cerebrais humanos (HALLGREN; SOURANDER, 1958).

4.1.3 Experimentos de *ICP-MS*

O experimento de *ICP-MS* foi realizado em uma sala limpa classe “1000” do laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o ELAN DRC II Perkin Elmer Sciex (Norwalk, CT, EUA) e executado com o programa Elan®, versão 3.4. Maiores detalhes técnicos estão descritos em uma publicação anterior (BATISTA et al., 2009). Valores de concentração de Fe, Cu, Zn e Al foram obtidos de amostras úmidas do tecido cerebral fixado (~75 mg) (Tópico 4.1.1), obtidas próximas (<2 mm) às regiões das amostras medidas no experimento RPE. Inicialmente, as amostras foram pesadas dentro de um tubo de 15ml Falcon® (Becton Dickinson) para serem diluídas em 1 ml de solução de hidróxido de tetrametilamônio a 50% (v/v), incubadas à temperatura ambiente durante 12 horas em um homogeneizador rotacional. Após a solubilização, o volume foi completado para 10 mL com uma solução contendo HNO₃ a 0,5% (v/v), Triton® X-100 a 0,01% (v/v) e 10 µg/L de Rh (BATISTA et al., 2009). A solução de fixação antes e após a aplicação no cérebro foi medida usando o mesmo procedimento para verificar se alguma quantidade significativa dos metais quantificados foi liberada à solução pelo cérebro durante o processo de fixação. Um material de referência (Lobster Hepatopancreas-TORT-2) do National Research Council, Canadá, foi analisado antes e após todas as seções de medição para verificar a acurácia das medições de *ICP-MS*.

4.1.3 Experimentos de RPE

O experimento de RPE foi realizado em um equipamento Banda-X (Jeol JES-FA-200) do departamento de Física da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados primeiramente em baixa temperatura com auxílio de nitrogênio líquido (-196 °C) e posteriormente em temperatura ambiente para detectar os possíveis íons paramagnéticos presentes nas amostras de tecido cerebral.

Espectros de RPE foram adquiridos em baixa temperatura (-196 °C) de amostras fixadas (75 mg) dos núcleos da base, substância branca e cinzenta de 9 sujeitos (1-4 e 9-13, Tabela 6). As amostras foram colocadas em um tubo de quartzo (diâmetro interno de 3 mm) e dentro de um recipiente térmico de quartzo, modelo

“Suprasil Large Volume Dewar Flask” do fabricante Wilmad-LabGlass, com aproximadamente 150 mL de nitrogênio líquido para a aquisição dos espectros. Os parâmetros dos espectros de RPE foram: campo magnético central de 250 mT, varredura de campo de 400 mT, tempo de varredura 4 minutos, amplitude da modulação de 1 mT, ganho de 50 e potência de micro-ondas de 2mW. Esta última determinada em um teste inicial de saturação de potência. Outro tipo de aquisição foi também realizado mudando a varredura para 1000mT, o campo central 500 mT e o tempo de varredura 15 minutos para adquirir a larga linha de ferritina com $g=2,0$. A execução a temperatura ambiente foi necessária para uma correta visualização da larga linha mencionada, que não era possível observar no experimento de baixa temperatura.

Em temperatura ambiente (22 °C), a amostra de solução de ferritina e as amostras fixadas (75 mg) dos núcleos da base, substância branca e cinzenta de 7 sujeitos (Tabela 6, sujeitos 5-10 e 13) foram primeiramente secas por liofilização e depois colocadas dentro de um tubo de quartzo (diâmetro interno de 3 mm) para a aquisição dos espectros de RPE. Amostras cerebrais dos sujeitos restantes não tiveram massa suficientes para serem analisadas em temperatura ambiente. Foi quantificada a massa da amostra antes de liofilizar e depois de liofilizar, para obter a razão massa úmida por massa seca. A razão foi usada para converter a concentração de metal por peso seco para peso úmido das amostras, para ser utilizada na correlação com os valores quantitativos de ressonância magnética (Capítulo 5).

Simulações de espectro de RPE foram realizadas no programa Matlab com as funções do pacote EasySpin (<http://www.easyspin.org/>) para separar as diferentes contribuições espectrais e identificar os íons paramagnéticos e as respectivas metaloproteínas. Utilizamos a condição de estado sólido (*solid-state cw EPR spectra*) por empregarmos amostras secas e a função *pepper* que modela o espectro de RPE para amostras secas de acordo com os parâmetros selecionados. Além dos parâmetros experimentais anteriormente descritos na simulação foram fornecidos como dados de entrada os valores iniciais de g , largura linha, constante de interação hiperfina e constantes referentes à distribuição da rede cristalina (D e E). Para o íon Fe^{+3} presente na ferritina na forma não nucleada utilizamos inicialmente: $g = 2$, largura de linha = (0 e 8) mT pico a pico com ajuste de (0 e ± 5) mT pico a pico e constantes referentes à distribuição da rede cristalina $D = 24900$ MHz, $E = 8300$ MHz com ajuste

de $D = \pm 2000$ MHz, $E = \pm 2000$ MHz. Para o íon Fe^{+3} presente na ferritina na forma nucleada utilizamos os valores de $g = 2,0$ com ajuste de $\pm 0,2$, largura de linha = (0 e 40) mT pico a pico com ajuste de (0 $\pm$ 30) mT pico a pico. Para o íon Cu^{+2} utilizamos os valores de $g = (2,05 \text{ e } 2,26)$ com ajuste de ($\pm 0,1$ e $\pm 0,1$), largura de linha = 3,336 mT pico a pico com ajuste de 1,0 mT pico a pico e constante de interação hiperfina $A = (42 \text{ e } 574)$ com ajuste de (60 e 60). Todos esses valores foram selecionados a partir dos valores reportados na Tabela 5.

4.2 Resultados e Discussões

4.2.1 Metais totais

Para diferentes metais presentes no material de referência encontramos concentrações (med) próximas da concentração do material de referência (ref): $\text{Fe}_{\text{med}} = 114 \pm 6 \mu\text{g/g}$ & $\text{Fe}_{\text{ref}} = 105 \pm 13 \mu\text{g/g}$; $\text{Zn}_{\text{med}} = 167 \pm 1 \mu\text{g/g}$ & $\text{Zn}_{\text{ref}} = 180 \pm 6 \mu\text{g/g}$; $\text{Cu}_{\text{med}} = 69 \pm 1 \mu\text{g/g}$ & $\text{Cu}_{\text{ref}} = 106 \pm 10 \mu\text{g/g}$. Exceto o valor da concentração de cobre que foi $31 \pm 3\%$ menor do que o esperado. Algum possível erro pode ter ocorrido na dissolução do material de referência ou na ionização durante a medida.

A concentração dos metais Fe, Cu, Zn e Al encontrados para os casos *postmortem* 9-13 (Tabela 6) estão descritos nas Tabelas 7-10. Adicionamos, ainda, os valores de concentração dos metais publicados pela literatura. A concentração de metais dos casos *postmortem* 1-4 (Tabela 6) foram muito maiores do que os casos 9-13 (Tabela 6) e dos reportados pela bibliografia (DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989; HALLGREN; SOURANDER, 1958; KREBS et al., 2014; YASUI; KIHARA; OTA, 1992). Assim, os casos 1-4 (Tabela 6) foram desconsiderados e os valores de concentração de metal total não foram reportados nesta tese. Uma possível contaminação das amostras pode ter ocorrido, uma vez que os casos 1-4 foram todos do mesmo hospital, obtidos juntos no mesmo mês e foram as primeiras amostras obtidas para esta tese. Para os seguintes casos, diversos cuidados experimentais foram tomados para evitar contaminações, como uso de água destilada ao invés de água comum da rede hidráulica do hospital e material de corte extremamente limpo.

A concentração de ferro encontrada para todas as regiões cerebrais dos casos 9-13 (Tabela 6) foi concordante com a concentração observada pelos autores

(DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989; HALLGREN; SOURANDER, 1958; KREBS et al., 2014), exceto a região THAE e THAD (Tabela 7). A região THA possui uma extensão grande e, portanto, a quantificação pode ter sido influenciada pela amostragem. O valor da concentração de ferro da região GPE e GPD do sujeito 13 foi muito alta ($\sim 400 \mu\text{g/g}$) e por ser um caso único, o seu valor não foi inserido na Tabela 7. As possíveis diferenças entre os valores da Tabela 7 pode ser devido a diferença de idade dos sujeitos e as diferentes técnicas utilizadas em cada trabalho (DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989; HALLGREN; SOURANDER, 1958; KREBS et al., 2014).

Tabela 7: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (**Fe**) medida por *ICP-MS* ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E)

Regiões	Valor Médio (n = 5)	Ref.* (n = ~50)	Ref.** (n = 12)	Ref.*** (n = ~22)
SND	154 (94-201)	184 $\pm$ 65	144 $\pm$ 65	210 $\pm$ 75
SNE	153 (63-215)	184 $\pm$ 65	144 $\pm$ 65	210 $\pm$ 75
RND	81 (38-146)	-----	61 $\pm$ 34	77 $\pm$ 57
RNE	78 (39-113)	-----	61 $\pm$ 34	77 $\pm$ 57
GPD	207 (120-309)	213 $\pm$ 35	183 $\pm$ 45	203 $\pm$ 38
GPE	198(73-298)	213 $\pm$ 35	183 $\pm$ 45	203 $\pm$ 38
PUTD	117 (61-74)	133 $\pm$ 34	119 $\pm$ 47	159 $\pm$ 37
PUTE	118 (69-188)	133 $\pm$ 34	119 $\pm$ 47	159 $\pm$ 37
THAD	67 (26-129)	47 $\pm$ 12	64 $\pm$ 22	49 $\pm$ 11
THAE	80 (18-134)	47 $\pm$ 12	64 $\pm$ 22	49 $\pm$ 11
NCD	76 (27-110)	92 $\pm$ 21	87 $\pm$ 30	106 $\pm$ 26
NCE	72 (25-92)	92 $\pm$ 21	87 $\pm$ 30	106 $\pm$ 26
SBD	51 (21-87)	42 $\pm$ 9	31 $\pm$ 8	45 $\pm$ 11
SBE	48 (20-82)	42 $\pm$ 9	31 $\pm$ 8	45 $\pm$ 11
SCD	55 (15-95)	38 $\pm$ 7	47 $\pm$ 12	41 $\pm$ 14
SCE	54 (23-90)	38 $\pm$ 7	47 $\pm$ 12	41 $\pm$ 14

*(HALLGREN; SOURANDER, 1958), **(DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989), ***(KREBS et al., 2014)

A concentração de ferro medida para a solução bruta de ferritina foi de $6,4 \pm 0,1 \text{ mgFe/ml}$ determinada *ICP-MS*, logo estimamos 1985 átomos de átomos de ferro

dentro da proteína, valor próximo dos 2145 átomos estimados com os dados do fabricante, assim concluímos que a proteína está parcialmente carregada. As concentrações das diluições da solução resultaram em $338,0 \pm 1,8$, $168,0 \pm 4,4$, $102,0 \pm 0,2$, $47,0 \pm 1,4$ $\mu\text{gFe/ml}$ de acordo com as concentrações esperadas de ferro para tecidos cerebrais humanos (HALLGREN; SOURANDER, 1958).

A concentração de cobre encontrada para todas as regiões foi concordante com a literatura (DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989) (Tabela 8).

Tabela 8: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (**Cu**) medida por *ICP-MS* ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E)

Regiões	Valor Médio (n = 5)	Ref.* (n = 12)	Ref.** (n = ~22)
SND	16 (6-25)	12 $\pm$ 3	16 $\pm$ 6
SNE	16 (4-29)	12 $\pm$ 3	16 $\pm$ 6
RND	14 (8-20)	10 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3
RNE	14 (8-21)	10 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3
GPD	12 (3-30)	12 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2
GPE	9 (4-16)	12 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2
PUTD	9 (4-12)	13 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2
PUTE	10 (5-13)	13 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2
THAD	8 (2-13)	10 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
THAE	7 (2-12)	10 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
CND	8 (3-12)	12 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1
CNE	8 (3-10)	12 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1
SBD	7 (2-13)	7 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
SBE	7 (4-9)	7 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
SCD	8 (3-14)	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
SCE	7 (3-12)	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1

*(DUFLOU; MAENHAUT; DE REUCK, 1989), **(KREBS et al., 2014)

Em geral, a concentração de zinco encontrada foi mais alta do que a reportada em um artigo recente (KREBS et al., 2014) (Tabela 9). A causa da diferença é desconhecida, talvez os sujeitos avaliados realmente possuíam maior concentração de Zn.

Tabela 9: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (**Zn**) medida por *ICP-MS* ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E)

Regiões	Valor Médio	Ref.*
	(n = 5)	(n = ~22)
SND	22 (15-31)	15 $\pm$ 5
SNE	23 (10-42)	15 $\pm$ 5
RND	31 (19-43)	13 $\pm$ 7
RNE	29 (17-44)	13 $\pm$ 7
GPD	22 (13-32)	13 $\pm$ 3
GPE	23 (10-35)	13 $\pm$ 3
PUTD	12 (6-16)	12 $\pm$ 3
PUTE	12 (6-17)	12 $\pm$ 3
THAD	17 (9-22)	12 $\pm$ 3
THAE	21 (9-41)	12 $\pm$ 3
CND	14 (7-21)	12 $\pm$ 3
CNE	15 (11-22)	12 $\pm$ 3
SBD	32 (17-57)	11 $\pm$ 2
SBE	28 (15-41)	11 $\pm$ 2
SCD	26 (14-54)	13 $\pm$ 5
SCE	20 (14-28)	13 $\pm$ 5

*(KREBS et al., 2014)

A concentração de alumínio encontrada em todas as regiões foi inferior ao que foi publicado por Yasui et al. (1992) (

Tabela 10). As causas de ter sido reportadas na literatura maiores concentrações podem ser diversas: contaminação das amostras e o uso de uma outra técnica de quantificação (*NAA*). Em alguns sujeitos *postmortem* não encontramos a

concentração de alumínio, por ser menor que a sensibilidade do aparelho de *ICP-MS* usado ($< 0,1\mu\text{g}$ de metal/g tecido úmido).

Tabela 10: Valores médios (mínimo-máximo) da concentração de ferro (**Al**) medida por ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) de 5 sujeitos da Tabela 6 (suj.9-13) comparados com valores médios $\pm$ desvio padrão extraídos da literatura para diferentes regiões do cérebro e hemisférios direito (D) e esquerdo (E)

Regiões	Valor Médio	Ref.*
	(n = 5)	(n = ~26)
SND	2 (1-2)	5 $\pm$ 0
SNE	1 (1)	5 $\pm$ 0
RND	1 (1-2)	-----
RNE	1 (1)	-----
GPD	1 (1)	3 $\pm$ 1
GPE	1 (1-2)	3 $\pm$ 1
PUTD	1 (1)	-----
PUTE	2 (2)	-----
THAD	1 (1-2)	-----
THAE	2 (2)	-----
CND	1 (1)	4 $\pm$ 0
CNE	2 (1-2)	4 $\pm$ 0
SBD	1 (0-1)	-----
SBE	1 (1)	-----
SCD	1 (0-2)	-----
SCE	1 (1)	-----

*(YASUI; KIHARA; OTA, 1992).

4.2.2 Íons Paramagnéticos

Amostras cerebrais fixadas e medidas em baixa temperatura apresentaram 4 grupos principais de picos no espectro de RPE (Figura 18) com amplitudes relativas diferentes em cada região cerebral avaliada.

Figura 18: Espectro de RPE subtraído do sinal de fundo e obtido em baixa temperatura com auxílio de nitrogênio líquido de amostra fixada do globo pálido esquerdo do sujeito 10. Os picos de ressonância indicados pelas setas foram identificados em espectros simulados.

Os valores do fator g , dos respectivos picos de ressonância, foram obtidos por meio de simulação. Os espectros de RPE apresentaram: $g = 5,8$ referente ao Fe^{+3} (de alto spin) que encontrado em proteínas heme como meta-hemoglobinas (KUBIAK; KRZYMINIEWSKI; DOBOSZ, 2013; SHIMA et al., 1997; ZECCA et al., 1996); $g = 4,28$ de Fe^{+3} (de alto spin) presente em proteínas não heme como transferrina e ferritina (SHIMA et al., 1997; WENDER et al., 1974; ZECCA et al., 1996); $g_{||} = 2,259$ e $g_{\perp} = 2,062$ de Cu^{+2} presente em ceruloplasmina desnaturada (KUBIAK; KRZYMINIEWSKI; DOBOSZ, 2013). Cu^{+2} possui um elétron desemparelhado com spin total $\frac{1}{2}$ que interage com o núcleo gerando no espectro 4 estreitas linhas com simetria axial, resultando em um fator g anisotrópico (MALMSTRÖM; VÄNNGÅRD, 1960). Na configuração de alto spin o Fe^{+3} contém cinco elétrons desemparelhados com predominância do acoplamento spin-spin dos elétrons, induzido por efeito dipolo-dipolo, resultando em uma simetria rômbrica com valor de fator- g efetivo $g = 4,28$ (AASA, 1970; CASTNER et al., 1960). Íons de Fe^{+3} apresentam $g=2,0$ quando estes não possuem interação spin-spin. Contudo, não foi possível observar no espectro resultante (sem sinal de fundo) o pico de ressonância esperado de $g = 2,0$ de Fe^{+3} .

que, segundo Weir e colaboradores (1985), corresponde à forma nucleada e apresenta sinal predominante no espectro de RPE (WEIR; PETERS; GIBSON, 1985).

Diferentemente de Weir e colaboradores (1985), utilizamos um dewar preenchido com nitrogênio líquido para resfriar a amostra, e não um fluxo de nitrogênio gasoso devido às nossas condições experimentais. Fato que gerou uma linha intensa e larga para todos os espectros adquiridos com dewar preenchido com nitrogênio líquido, incluindo os do tubo vazio (Figura 19). Contudo, a amplitude do sinal foi mais intensa para o espectro do tubo vazio do que com a amostra e, então, inviável de subtrair-lo do sinal da amostra. Com uma varredura de 0 a 1000 mT podemos observar que o sinal de fundo possuía um $g = 1,89$. A fonte dessa linha intensa e larga ainda é desconhecida, acreditamos que esteja relacionada com a concentração de linhas de campo magnético dentro da cavidade devido à interação do dewar e do tubo com nitrogênio líquido.

Figura 19: Espectros de RPE para diversas condições experimentais.

A Figura 20 mostra espectros de RPE simulados em temperatura ambiente, e experimentais da amostra do globo pálido esquerdo do sujeito 13 e da solução de ferritina. Nessa temperatura os espectros apresentaram picos de ressonância para os íons Fe^{+3} e Cu^{+2} como observado em baixa temperatura (Figura 20) e conforme relatado por outras pesquisas (WENDER et al., 1974; ZECCA et al., 1996), exceto o pico $g = 5,8$ presente em proteína heme devido à menor sensibilidade do RPE para a aquisição em temperatura mais elevada. Por outro lado, observamos um pico de ressonância do íon Fe^{+3} de $g=2,0$ (WEIR; PETERS; GIBSON, 1985) que não foi possível isolar em baixa temperatura. Assim, os espectros de RPE adquiridos nas

duas condições possibilitou quantificar diferentes íons paramagnéticos, destacando o Fe^{+3} de $g = 2,0$ da ferritina. O espectro do sinal de fundo apresentou um sinal com presença de picos característicos de impurezas do tubo e de oxigênio do ar da sala (Figura 21). Como a concentração de oxigênio na sala foi considerada constante, fizemos uma magnificação do espectro da amostra até que a amplitude pico a pico do oxigênio paramagnético fosse a mesma do tubo vazio e em seguida subtraiu-se o espectro do sinal de fundo (Figura 21).

Figura 20: Espectros de RPE simulados e adquiridos da amostra liofilizada do globo pálido do hemisfério esquerdo do sujeito 13 em temperatura ambiente. Os picos de ressonância são identificados em espectros simulados isolados.

Figura 21: Espectros de RPE em temperatura ambiente. Sinal de fundo obtido com tubo sem (A) e com amostra de tecido cerebral (B). Sinal (B) com subtração do sinal (C).

Figura 22 apresenta os espectros de RPE obtidos em temperatura ambiente, normalizado e com subtração do sinal de fundo para 2 sujeitos (6 e 14, Tabela 6) que tiveram amostras liofilizadas. O sujeito 14 que é um paciente com doença de Parkinson apresentou qualitativamente espectros semelhantes de RPE para cada região em comparação a todos os outros. Contudo, por ser somente de um paciente não temos estatística suficiente para maiores conclusões.

Figura 22: Espectros de RPE normalizados e com subtração do sinal de fundo para diferentes sujeitos e regiões. Substância negra (SN), globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC), tálamo (THA), substância branca (SB) e as letras E e D que seguem são referentes ao lado esquerdo e direito.

As Tabela 11 e 12 mostram os valores médios e desvio padrão dos parâmetros simulados dos espectros de RPE obtidos para todas as regiões estudadas (Tópico 4.1.1) em temperatura ambiente para cada sujeito. Pois, todas as regiões de cada sujeito apresentaram valores dos parâmetros simulados muito semelhantes ($p < 0,05$) Destaque para a largura de linha dos picos de ressonância que foram constantes, permitindo o uso da amplitude pico a pico como quantidade proporcional a concentração de íons paramagnéticos. Exceto o sujeito 13, que apresentou uma significativa redução da largura de linha e um aumento da amplitude pico a pico para o pico de $g = 2,0$, que está correlacionado com a sua maior concentração de ferro (Tabela 11). O restante dos parâmetros tanto para Fe^{+3} e Cu^{+2} não foram diferentes significativamente entre sujeitos e nem entre regiões. Indicando que em ambas as regiões dos sujeitos apresentaram semelhantes característica paramagnética para as metaloproteínas quantificadas. Destacamos o valor da razão E/D para o Fe^{+3} de $g \sim 4,28$ que foi próximo de $1/3$, indicando uma simetria rômica (COSTA FILHO, 2001). Adicionalmente, não observamos variação de g , constante hiperfina e das constantes referentes à distribuição da rede cristalina em relação a variação da concentração total de ferro e cobre para qualquer região cerebral. Isso significa que o ambiente eletrônico do sítio do íon paramagnético foi independente da concentração de metal total.

Tabela 11: Valores médio (desvio padrão da média) de parâmetros simulados de espectros de RPE para as regiões dos núcleos da base e lobo parietal obtidos em temperatura ambiente para os picos de Fe^{+3} de $g = 2,0$ e $g = 4,28$

Sujeito	Região $g \sim 2,0$		Região $g \sim 4,28$			
	g	Largura de linha (MHz)	D (MHz)	E (MHz)	E/D	Largura de linha (MHz)
5	2,078±0,027	51,84±5,77	25546±641	8497±276	0,333±0,002	9,38±1,18
6	2,081±0,016	55,26±1,64	25397±775	8496±285	0,334±0,002	9,82±0,36
7	2,080±0,012	53,31±4,26	25062±937	8294±277	0,331±0,001	10,27±1,79
9	2,041±0,008	47,54±2,69	26476±829	9060±639	0,342±0,001	10,54±1,69
10	2,060±0,011	60,42±4,20	26034±1202	8946±584	0,344±0,001	10,24±1,31
13	2,016±0,003	16,14±2,35	25354±1573	8520±663	0,336±0,001	10,66±1,36
14	2,034±0,009	58,93±4,20	25869±1185	8620±423	0,333±0,001	10,43±1,17
Média	2,055±0,016	49,06±3,55	25676±1020	8633±449	0,336±0,001	10,19±1,35

Tabela 12: Valores médio e desvio padrão da média de parâmetros simulados de espectros de RPE para as regiões dos núcleos da base e lobo parietal obtidos em temperatura ambiente para os picos de Cu^{+2}

Sujeito	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\perp}$	$A_{\parallel}$	Largura de linha (MHz)
5	2,063±0,003	2,261±0,003	37±6	538±12	3,91±0,24
6	2,066±0,001	2,262±0,013	6±14	551±17	3,98±0,23
7	2,054±0,008	2,265±0,006	48±10	553±11	3,25±0,66
9	2,062±0,005	2,271±0,035	44±9	536±13	3,58±0,16
10	2,065±0,001	2,257±0,002	38±6	543±6	3,75±0,23
13	2,065±0,001	2,258±0,001	28±23	544±9	3,78±0,22
14	2,064±0,001	2,257±0,001	31±7	557±9	4,12±0,24
Média	2,062±0,003	2,261±0,008	33±11	546±11	3,85±0,28

Segundo Weir e colaboradores (1985), os íons Fe^{+3} presentes na ferritina com $g = 4,28$ e $g = 2,0$ são possivelmente nanopartículas de ferrihidrita de sítios de nucleação e de nanopartículas já nucleadas na proteína, respectivamente (Figura 4). Weir e colaboradores (1985) mostraram que o pico de ressonância $g = 4,28$ é predominante no espectro de ferritina com baixa razão ferro/proteína e a amplitude pico a pico decresce com o aumento de nanopartículas de ferro nucleadas na proteína. Nossos resultados referentes aos picos de ferritina mostram o mesmo comportamento com a concentração de ferro (Figura 23). Observamos uma dependência significativa entre a razão das amplitudes pico a pico ($g = 2,0/g = 4,28$) e a concentração total de ferro. A região do globo pálido mostrou maior concentração de ferro e consequentemente maior razão da amplitude pico a pico ($g = 2,0/g = 4,28$), indicando que a ferritina desta região possui mais ferro na forma nucleada.

Figura 23: Razão da amplitude dos picos do espectro de RPE da ferritina versus a concentração de ferro determinado por *ICP-MS*. A linha pontilhada no gráfico esquerdo indica os valores da ferritina isolada do cavalo. Amostras cerebrais foram do sujeito 9

(vermelho), 10 (preto) e 13 (azul). Globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC) e tálamo (THA).

Por outra parte, a razão da amplitude pico a pico de Cu^{+2} ($g = 2,062/g = 2,259$) foi quase constante entre as regiões e não mostrou dependência com a concentração total de cobre (Figura 24). Esse resultado sugere que o cobre presente na ceruloplasmina está em um ambiente eletrônico semelhante para todas as regiões cerebrais.

Figura 24: Razão da amplitude dos picos do espectro de RPE da ceruloplasmina versus a concentração de cobre total determinada por *ICP-MS*. A linha pontilhada no gráfico esquerdo indica os valores da ferritina isolada do cavalo. Amostras cerebrais foram do sujeito 9 (vermelho), 10 (preto) e 13 (azul). Globo pálido (GP), putâmen (PUT), núcleo caudado (NC) e tálamo (THA).

Apenas os valores de amplitude pico a pico do Fe^{+3} ($g = 2,0$) correlacionaram com a concentração total de ferro quantificada por *ICP-MS* ($R^2 = 0,92$) (Figura 25). Portanto, o sítio de ferro de $g = 2,0$ é o mais abundante para a proteína ferritina (WEIR; PETERS; GIBSON, 1985) e nós corroboramos isso ao ter uma forte relação linear com a concentração total de ferro ($R^2=0,93$) (Figura 25). Zecca et al., (1996) também não observaram correlação entre a amplitude pico a pico do sinal de RPE em $g = 4,28$ com a concentração de ferro total. Os autores justificaram a baixa correlação dizendo que o experimento de RPE tem baixa especificidade para detectar a concentração de íons paramagnéticos.

Figura 25: Correlação entre amplitude pico a pico da linha $g = 2,0$ (Fe^{+3}) e concentração total de ferro. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais dos sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◀), globo pálido (■), putâmen (▶), núcleo caudado (♦) e tálamo (●).

O íon de cobre somente foi detectado pelo espectro de RPE em tecido fixado em formol, o que sugere que não estamos identificando todo o cobre e ainda é dependente do processo de fixação. O efeito da fixação em formol nos resultados de RPE a temperatura ambiente é mostrado na Figura 26. Os picos de RPE referentes à ferritina foram detectados na condição de não fixado e fixado por 18 e 39 dias (Figura 26) para amostras cerebrais do sujeito 8. Por outro lado, os picos referentes à ceruloplasmina foram identificados somente nas amostras fixadas. Fato que sugere a ocorrência de uma mudança química a ser estudada na amostra que foi fixada. Em concordância com a simulação do espectro de RPE que indicou a presença de ceruloplasmina já em estado desnaturado (Figura 18). Um pico de ressonância estreito de $g = 2,0$ apareceu em todas as amostras não fixadas, exceto no globo pálido direito, e é possivelmente de radicais livres gerados durante o processo de secagem por liofilização (BERLINER, 2016). Todavia, não foi observado o pico de ressonância do radical livre para as amostras fixadas, possivelmente porque a fixação gera proteínas de maior peso molecular (BIRKL et al., 2016) e, conseqüentemente, menos dissociáveis no processo de liofilização. A amostra do globo pálido direito não fixada não apresentou o pico estreito de radical livre, porque foi sobreposto por um sinal de ressonância RPE produzido por uma alta concentração de ferro na ferritina.

Figura 26: Espectros de RPE de amostras cerebrais do sujeito 8 na condição não fixada, fixada por 18 e 39 dias. Espectros ruidosos são de amostras que tinham pouca massa.

4.3 Conclusão

O ferro apresentou a maior concentração de metal nos tecidos cerebrais em geral, seguido por Zn, Cu e Al. Íons paramagnéticos como Fe^{+3} e Cu^{+2} foram quantificados em todos os tecidos cerebrais avaliados e seus respectivos parâmetros de RPE não foram diferentes significativamente entre sujeitos e nem entre regiões. Indicando a presença de metaloproteínas magneticamente semelhantes em todos os tecidos cerebrais humanos. Metaloproteínas contendo Fe^{+3} foram identificadas nos espectros de RPE como metemoglobina e ferritina, e Cu^{+2} como ceruloplasmina desnaturada. Outro importante resultado e ainda não reportado na literatura foi a correlação linear entre a razão da amplitude pico a pico de Fe^{+3} nucleado por não nucleado em relação à concentração de ferro, indicando que o ferro é depositado principalmente na proteína de forma nucleada. Por último, observamos que Fe^{+3} é o íon paramagnético em maior concentração nos tecidos cerebrais e assim é o metal

que mais pode ser detectado por mapas quantitativos de RM em cérebro de sujeitos sem doença neurológica, como sugerido pela literatura (SCHENCK, 1996). Íons paramagnéticos de Cu^{+2} também foram observados para os tecidos cerebrais, mas somente após a fixação em formol.

Capítulo 5

5 Quantificação por Ressonância Magnética

Este capítulo aborda a quantificação de mapas de RM (QSM, $R2^*$ e $R2$) em encéfalos de sujeitos *postmortem in situ* e *ex situ*, objetos simuladores e camundongos injetados com nanopartículas superparamagnéticas. Correlações linear entre mapas de RM e valores da concentração de metais ou íons paramagnéticos obtidos no Capítulo 4 são avaliadas para definir a sensibilidade e especificidade dos mesmos. Por último, é apresentado um dispositivo de baixo custo para corregristo automático de cortes de encéfalos e imagens de RM.

5.1 Metodologia

5.1.1 Sujeitos *postmortem*

Os sujeitos *postmortem* que foram estudados neste capítulo são os mesmos citados na Tabela 6, a exceção do sujeito 8 que foi estudado apenas por experimento de RPE. A quantificação por ressonância magnética foi incluída no termo de consentimento livre e esclarecido e aprovado pelos comitês de ética citados no Tópico 4.1.1. Um sujeito vivo, saudável, masculino e com 56 anos foi também recrutado para ser voluntário da aquisição das mesmas sequências de imagens adquiridas para os sujeitos *postmortem*. Do sujeito 6 também foi obtido, de forma retrospectiva, a imagem estrutura *in vivo* com data de dois meses antes do falecimento, que utilizamos na avaliação de corregristo automático.

5.1.2 Preparação de animais

Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com a regulação do *ICube Laboratory of Institut de Physique Biologique of University at Strasbourg*. Avaliamos 6 camundongos brancos swiss, com aproximadamente 30 g de peso e sete semanas de idade. Dois animais foram considerados controles e 4 foram injetados com nanopartículas superparamagnéticas e recobertas com uma camada

de dendros para evitar a toxicidade (*SPIONs*, sigla em inglês de *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*). Cerca de 300 μl de uma solução de 3,4 mM de *SPIONs* foram injetados na veia da cauda de cada um dos 4 camundongos. A solução de *SPIONs* foi fornecida em forma de colaboração pelos autores do artigo (TRUONG-PHUOC et al., 2015). A caracterização das *SPIONs* é descrita na referência anterior.

5.1.3 Objetos simuladores

Soluções de ferritina de baço de cavalo (Ref. F4503, Lote SLBK7557V, Sigma-Aldrich, EUA) foram utilizadas em um objeto simulador para aquisição de imagens de RM em 3T. A concentração de ferro das soluções utilizadas foram $338,0 \pm 1,8$, $168,0 \pm 4,4$, $102,0 \pm 0,2$, $47,0 \pm 1,4$ $\mu\text{gFe/ml}$, que foram quantificadas previamente por *ICP-MS* no tópico 4.2.1. Cada solução de ferritina preencheu balões finos de látex (comprimento ~ 9 cm, diâmetro de 6 mm). Balões individuais foram colocados em frascos de plástico embutidos em uma matriz de gelatina bovina de *bloom* 240 (6%). Finalmente, os frascos de plástico foram inseridos dentro de um vidro Becker cheio com água (3 litros).

Com a solução de *SPIONs* foi montado um segundo objeto simulador formando por cinco balões cilíndricos de latex (comprimento de 9 cm e diâmetro de 6mm) para aquisição de mapas quantitativos de RM (Figura 7). Cada balão foi preenchido com solução de *SPIONs* de diferente molaridade 0, 25, 50, 100 e 200 μM seguindo a literatura valores já propostos (LIU et al., 2010), sendo a respectiva concentração de ferro 0, 1,4, 2,8, 5,6, 11,2 $\mu\text{gFe/ml}$ determinada por *ICP-AES*. Todos os balões foram fixados dentro de um tubo de plástico (comprimento de 115 cm e diâmetro de 30 mm) com uma matriz de gelatina bovina de *bloom* 240 (6%).

Figura 27: Foto do objeto simulador formado por cinco balões cilíndricos de látex preenchidos com *SPIONs* em concentração de 1,4 $\mu\text{gFe/ml}$ (amarelo), 2,8 $\mu\text{gFe/ml}$ (roxo), 5,6 $\mu\text{gFe/ml}$ (azul), 11,2 $\mu\text{gFe/ml}$ (vermelho) e somente com água (verde).

5.1.4 Aquisição de imagens de RM

Sujeitos *postmortem*

Imagens de ressonância magnética de encéfalos *in situ* (dentro do cadáver) e *ex situ* (cérebro fixado) foram adquiridas dos mesmos 5 sujeitos (enumerados de 9-13 Tabela 6) no HCFM. Os critérios de seleção foram os mesmos do Tópico 4.1.1. Em adição, imagens de rotina de tomografia computadorizada foram adquiridas destes sujeitos antes das imagens de ressonância para detectar possíveis lesões encefálicas e servir de critério de exclusão. O equipamento utilizado para adquirir tomografia computadorizada foi o Emotion 16 da marca Siemens do HCFM. A temperatura auricular de cada aquisição *in situ* destes sujeitos foi medida no início de cada aquisição de imagens *in situ*. Posteriormente à aquisição de imagens dos encéfalos *in situ*, foi retirado o encéfalo no serviço de verificação de óbito do HCFM em até 12 horas por técnicos de necropsia do mesmo serviço. Os cérebros extraídos foram fixados em solução de 4% de formaldeído por mais de 120 dias em temperatura de 20°C, essa temperatura foi usada também para evitar a formação de bolhas de ar. O longo tempo de fixação foi escolhido para garantir uma homogênea fixação de todo o cérebro (DAWE et al., 2009). Após a fixação, o encéfalo todo foi retirado do recipiente de fixação sem que houvesse o contato direto com o ar e transportado para o equipamento de ressonância magnética dentro de dois sacos plásticos contendo solução de 4% de formaldeído. Com esse procedimento, evitou-se a formação de bolhas de ar dentro do cérebro que resultariam em grandes artefatos nas imagens. Por último, os encéfalos foram cortados em orientação coronal com um centímetro de espessura (Figura 17) usando uma faca de aço inox. Finalmente, o cérebro foi amostrado como descrito no Tópico 4.1.1 para correlacionar as medidas quantitativas de ressonância magnética com a concentração de metais e íons paramagnéticos medidas no Capítulo 4. Adicionalmente, imagens de um sujeito vivo saudável (homem e 56 anos) foram adquiridas para uma comparação qualitativa com os resultados de *postmortem*.

Dos indivíduos 1-7 e 14 não foi possível adquirir imagens *in situ*, pois não foi autorizada pela coordenadoria do hospital. A aquisição *ex situ* foi realizada da mesma forma nos dois hospitais. Os encéfalos foram embalados em sacos plásticos e posicionados no equipamento de ressonância magnética com a mesma orientação da

condição *in situ* e apoiados com sacos de areia para que diminuísse a vibração do encéfalo durante a aquisição das imagens.

Os equipamentos de RM (3T) utilizados no HCFMRP e no HCFM foram da mesma marca e modelo (PHILIPS, Achieva). Também foi utilizado uma bobina de trinta e dois canais com capacidade para aplicar a técnica de aquisição de imagens acelerada SENSE. Todas as imagens de magnitude e fase foram reconstruídas pelas máquinas e utilizadas no processamento dos mapas.

Uma sequência 3D de múltiplos Ecos de Gradiente foi otimizada para adquirir imagens e gerar mapas quantitativos de relaxometria $R2^*$ e susceptibilidade magnética. Outra sequência 2D de múltiplos Ecos de Spin foi otimizada para adquirir imagens e gerar mapas de relaxometria $R2$. Ainda, uma sequência MPRAGE 3D ponderada em T1 foi adquirida para fornecer informação anatômica. Os parâmetros das sequências são descritos na Tabela 13:

Tabela 13: Parâmetros de sequências de aquisição de imagens

Aquisição	R2	R2* e QSM	T1w-corregistro
Sequência:	Ecos de Spin	Ecos de Gradiente	Eco de Gradiente
TE (ms)	18,0-11 ecos*12	3,7-10,0-16,3-22,7	3,7
TR (ms)	3000	33	7,9
Ângulo (°)	90	20	6
BW (Hz/pixel)	433	432	217
Matriz	480x480x160	480x480x160	320x320x240
Resolução (mm ³)	0,5x0,5x2,0	0,5x0,5x2,0	0,75x0,75x0,75
Tempo (minutos)	20	10	6

As sequências de imagem acima foram adquiridas para os cérebros *postmortem in situ* e *ex situ*, objeto simulador e sujeito saudável. Para o sujeito 6 (Tabela 6) foi obtido *in vivo* somente a sequência 3D Eco de Spin citada anteriormente. Esta foi utilizada no estudo do dispositivo de corregristo automático. Os dois objetos simuladores foram orientados com seu eixo maior paralelo ao campo magnético principal.

Animais controles e injetados

Imagens de ressonância magnética de dois animais controles e quatro animais injetados, todos sacrificados logo antes do exame, foram obtidas no scanner 7T (Bruker, BioSpin) do *ICube Laboratory of Institut de Physique Biologique of University at Strasbourg* durante um estágio de 2 meses em Strasbourg na França. Para calcular mapas de $R2^*$ e mapas susceptibilidade, foi adquirida imagens de sequência de múltiplos Ecos de Gradiente (TR = 40 ms, TE = 3,4, 8,4 13,4, 18,4, 23,4 e 28,4 ms, BW = 232 Hz/pixel, matriz 256x128x80, médias N = 4 e resolução isotrópica 0,3 mm). A mesma sequência de aquisição de imagens foi realizada para um objeto simulador com diferentes concentrações de *SPIONs*. Também para o simulador foi adquirida a sequência de imagens T1 RARE com TR variável (TR = 208, 400, 800, 1500, 3000 and 3500 ms), TE = 14 ms; matriz 64x64, resolução isotrópico de 0,3 mm) para calcular o mapa de R1 visando o estudo destas nanopartículas magnéticas como agentes de contraste.

5.1.5 Processamento dos mapas quantitativos de RM

Sujeitos *postmortem*

Os mapas de relaxometria dos sujeitos *postmortem* foram processados usando uma abordagem pixel-por-pixel em funções no programa Matlab escritas pelo autor desta tese e seguindo os passos previamente descritos de (BARBOSA et al., 2015). Em ambos os mapas foi calculado um ajuste mono exponencial do sinal em função dos tempos ao eco, em que o resultado do coeficiente exponencial representa as taxas de R2 ou $R2^*$ de acordo com o dado analisado.

Os mapas QSM dos sujeitos *postmortem* foram gerados seguindo os códigos previamente descritos em Wang e Liu (WANG; LIU, 2015) e acessados de <http://weill.cornell.edu/mri/pages/qsm.html>. As seguintes etapas foram realizadas nas imagens de magnitude e fase: 1) O crânio e o formaldeído foram removidos utilizando uma máscara manual para cérebro *postmortem in situ* e *ex situ*, respectivamente. A máscara foi segmentada manualmente no primeiro eco da imagem de magnitude; 2) O sinal complexo (combinação de magnitude e fase) foi normalizado pelo ruído da imagem de magnitude para remover a possível dependência com relação sinal-ruído; 3) Ajuste linear do valor de fase para remover a fase evoluída por outros efeitos além da diferença de susceptibilidade do tecido como de condutividade, correntes de Foucault e erros de combinação dos canais da bobina de radiofrequência (HAACKE

et al., 2015); 4) Desenrolamento da imagem de fase para remover algumas fases que permaneceram enroladas; 5) O mapa de campo de fundo foi extraído com o *Projection Dipole Filter (PDF)* (DE ROCHEFORT et al., 2010) e 6) Inversão de dipolo pelo método de regularização utilizando o algoritmo *Morphology Enable Dipole Inversion (MEDI)* (Liu et al., 2011), com parâmetro lambda igual a 1000 (otimizado empiricamente para ambas as condições). O algoritmo *MEDI* foi escolhido devido à alta acurácia (Wang e Liu, 2015) e ao vasto uso em estudos clínicos (CHANG et al., 2016; DU et al., 2016; TIAN LIU et al., 2012; WISNIEFF et al., 2015). Os valores relativos de susceptibilidade ($\Delta\chi$) foram calculados considerando como região de referência a substância branca occipital para cérebros *postmortem in situ* (LANGKAMMER et al., 2012) e para cérebros fixados. Os artefatos devido a bolha de ar no mapeamento de MRI foram minimizados no processo de fixação e removidos por uma máscara manual em imagens como descrito previamente em um artigo (ZHENG et al., 2013). As correções de temperatura nos valores de susceptibilidade entre cérebro *in situ postmortem* e cérebro fixo foram aplicadas usando $\chi_{36.5} = \chi_{medida} * (273 + T_{cérebro} / 273 + 36.5)$ (LANGKAMMER et al., 2012).

O filtro *PDF* não foi usado no processamento *QSM* dos objetos simuladores. O campo magnético de fundo foi removido usando um ajuste polinomial de superfície (5ª ordem) para a região de água no objeto simulador, segmentado manualmente, sobre a imagem de fase previamente ajustada e desenrolada (Figura 28-A-B) (ZHENG et al., 2013). A partir do ajuste polinomial, o campo magnético foi extrapolado para a região interna dos objetos simuladores (Figura 28-C para objeto simulado de solução de ferritina) e subtraído do campo magnético inicial. O mapa *QSM* dos objetos simuladores foi finalmente calculado utilizando o algoritmo *MEDI* (Figura 28-D) e uma região da gelatina foi utilizada como referência.

Figura 28: Processamento do objeto simulador com solução de ferritina. (A) imagem de fase ajustada e desenrolada, (B) mapa de campo magnético de fundo usando ajustado por polinomial de superfície (5ª ordem) para a região de água no objeto simulador, (C) mapa de

campo magnético de fundo extrapolado para toda a imagem, (D) Mapa QSM do objeto simulador.

Animais injetados

O mapa de $R2^*$ foi calculado aplicando o algoritmo de Auto-Regressão em Operações Lineares ao valor absoluto dos dados complexos de MR (PEI et al., 2015). Para o mapa de susceptibilidade, calculou-se o mapa de campo magnético dos dados complexos de RM usando um ajuste não-linear de mínimos quadrados (LIU et al., 2013). Utilizou-se o algoritmo simultâneo de desenrolamento de fase e separação água e gordura, porque o fígado foi quantificado e seus valores poderiam ser influenciados pela gordura (DONG et al., 2015). Uma máscara para a reconstrução QSM foi criada aplicando um algoritmo de crescimento de região à imagem de magnitude no software de processamento de imagem ITK-Snap (YUSHKEVICH et al., 2006). O mapa QSM foi então construído por inversão de dipolo de campo total pré-condicionada do mapa de campo corrigido (LIU et al., 2016). Sendo assim, uma máscara para o pré-condicionador foi criada por um limiar aplicado ao mapa do desvio padrão do ruído para aproximadamente identificar o ar, regiões de tecido com agente de contraste e regiões de tecido sem agente de contraste. Valores de voxel superiores a 1 foram ajustados para 30, valores superiores a 0,5 ajustados para 10 e Valores inferiores a 0,5 ajustados para 1. Valores fora da máscara de pré-condicionador foram ajustados para 1000.

5.1.6 Corregistro de imagens

Um corregistro de corpo rígido foi realizado entre as fotos dos cortes de cérebro e as imagens de RM (Figura 29). As imagens de RM (T1w, T2w e T2*w) foram previamente corregistradas entre elas usando a função padrão *Coregister:Est&Res* no programa *Statistical Parametric Mapping* (acessado em <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12>) e a imagem fixa foi a T2*w. Posteriormente, foi aplicada uma mudança da resolução espacial de $0,479 \times 0,479 \times 2,0 \text{ mm}^3$ para $1,0 \times 1,0 \times 1,0 \text{ mm}^3$ das imagens T1w, T2w, T2w* e o mapa QSM. Por último, foi transformada a orientação de todas as imagens de axial para coronal. Com essas imagens foi realizada uma seleção manual dos cortes referentes as fotos utilizando o programa *SPIN* (Signal Processing in NMR, Detroit, MI, USA) (ZHENG et al., 2013), considerando detalhes anatômicos (giros, sucos, veias e estruturas) observados nas imagens T1w (Figura 29). Foram selecionados de 5 a 10

cortes para segmentar manualmente as regiões cerebrais e extrair os valores de $R2$, $R2^*$ e QSM , porque cada corte possuía um 1 mm de espessura e a região cerebral amostrada tinha até 1 cm de espessura. As regiões segmentadas foram: SN, GP, NR, PUT, NC, THA, SB e SC. Adicionamos ao nome de cada região a letra E ou D indicando o lado esquerdo e direito do sujeito, respectivamente.

Figura 29: Exemplo de segmentação de algumas regiões de interesse para o sujeito 13 (58 anos). Imagem de uma fatia de 1 cm de espessura do cérebro fixado na orientação coronal (esquerda), imagem T1w (centro) e mapa QSM (direita). As cores são referenciadas às regiões segmentadas: globo pálido esquerdo (vermelho escuro), putâmen esquerdo (vermelho claro), globo pálido direito (marrom), putâmen direito (laranja), núcleo caudado esquerdo (verde escuro) núcleo caudado direito (verde claro). (E) indica o lado esquerdo na orientação do paciente e (D) o direito.

Um dispositivo físico para corrigir automaticamente cortes anatômicos e imagens de RM foi utilizado para os sujeitos do HCFM (5-8) para diminuir os possíveis erros de correção. Não foi utilizado em todos os sujeitos porque o dispositivo foi desenvolvido após ter ocorrido a aquisição de alguns casos. Este dispositivo foi criado com base em um outro previamente publicado que utilizava uma caixa 3D impressa para encaixar anatomicamente o cérebro e espaçado para ser cortado com uma faca igual aos cortes já feitos na imagem de RM (ABSINTA et al., 2014). No entanto, a caixa 3D tinha um alto custo de fabricação (US\$ 300,00) e necessitava de 24 horas para imprimir, além do planejamento computacional para a impressora 3D. O dispositivo foi construído em anéis de espessura 3 mm, raio interno de 150 mm e altura de 9 mm que foram fixados sobrepostos com espaços de 1,8 mm totalizando 185 mm de altura. O custo de fabricação foi aproximadamente de US\$ 50,00 somado de \$ 2,00 para gelatina e é reutilizável para muitos casos, sendo necessário apenas o consumo de gelatina. Logo abaixo a Figura 30 apresenta maiores detalhes do dispositivo e fotos.

Figura 30: Dispositivo para cortes de encéfalo coregistrados automaticamente com imagens de RM. (A) Imagem de dispositivo e encéfalo simulados com as reais dimensões. Imagens em diferentes orientações do dispositivo simulado (B-D) e foto do mesmo montado (C&E).

Para usar o dispositivo, foi necessário primeiro imergir o dispositivo no recipiente de fixação do encéfalo, adicionar gelatina diluída para concentração final de 10% e retirar do pote com auxílio de saco plástico sem deixar o encéfalo entrar em contato com o ar. Posteriormente, deve-se deixar a gelatina endurecer na geladeira por cerca de 6 horas e adquirir imagens de RM de todo o conjunto. A aquisição das imagens deve proceder como no tópico 5.1.4, e com a imagem 3D MPRAGE ponderada em T1 deve ser feito uma reconstrução com seleção dos cortes na mesma orientação do dispositivo, já que o dispositivo apresenta um hiposinal (

Figura 31).

Figura 31: Seleção de cortes para reconstrução de imagem ponderada em T1 de um encéfalo fixado.

Após a aquisição das imagens, o dispositivo com o encéfalo dentro do saco plástico é separado em fatias ou anéis. Primeiro deve ser removido o saco plástico e depois duas das três hastes do dispositivo. Em uma segunda etapa, os anéis são cortados com uma faca afiada de aço inox. Durante os cortes, os anéis vão sendo removidos (Figura 32). Como o encéfalo está fixado em gelatina muito concentrada (10%) o movimento do encéfalo é mínimo dentro do dispositivo.

Figura 32: Foto de encéfalo fixado e cortado no dispositivo de corte corrigido com imagem de RM.

5.1.7 Análise Estatística

Um modelo de regressão linear ($p < 0,05$ correção) foi aplicado para avaliar a relação entre as taxas de relaxação e os valores de susceptibilidade *in situ* e *ex situ* com a concentração de metal e íons paramagnéticos das regiões cerebrais. Regressão linear com múltiplos parâmetros foi aplicada para valores quantitativos de RM e concentração de Al, Zn, Fe e Cu. Valor de $p < 0,05$ corrigido foi considerado estatisticamente significativo. Apenas três sujeitos *postmortem* (enumerados de 9, 10 e 13 na Tabela 6) puderam ser avaliados pelos modelo citado acima, já que somente estes sujeitos tiveram imagens adquiridas *in situ* e não apresentaram artefatos nos mapas *ex situ*. Os artefatos citados são oriundos de bolhas de ar nos vasos, nas artérias, nos ventrículos, entre as meninges e dentro do próprio tecido.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Sujeitos

Um alto contraste entre tecido cerebral e regiões com alta concentração de ferro (Tabela 1) foi observado nos mapas *QSM* e $R2^*$ em *in situ* e *ex situ* (Figura 33). Contraste do mapa *QSM* em ambas as condições foi similar a um prévio trabalho piloto (SCHWESER et al., 2011a). Maiores valores de $R2^*$ e susceptibilidade foram observados para veias e artérias de cérebro *in situ* comparado com *ex situ* e *in vivo* (Figura 33), conforme observado para *in situ* em relação a *in vivo* em um trabalho anterior (SUN et al., 2015). Os mapas cerebrais *postmortem in situ* apresentaram um contraste próximo à condição *in vivo*, com exceção das veias e artérias (Figura 33). Também foi observado um aumento de $R2^*$ no parênquima cerebral *ex situ*. Ambas as observações indicam possíveis mudanças das propriedade do tecido e da composição do sangue no processo de fixação (BIRKL et al., 2016). O mesmo comportamento foi observado quando comparado o cérebro *in situ* com a condição *ex situ* (Figura 33). O valor elevado no tecido não fixado pode estar relacionado principalmente com o comportamento paramagnético do sangue desoxigenado dentro do sistema venoso. Nos tecidos cerebrais fixados em formaldeído, a fixação pode ter contribuído para suprimir a veia e as artérias, um efeito esperado pela diluição em solução de formaldeído e extração de sangue da amostra durante o processo de fixação. Por outro lado, o mapa $R2$ do cérebro *postmortem in situ* não mostrou veias e artérias porque a sequência *Eco de Spin* é menos sensível a grandes vasos (KENNAN; ZHONG; GORE, 1994). No entanto, explicações definitivas para as diferenças de valores de susceptibilidade não são totalmente claras e estudos futuros devem ser realizados. Valores de *QSM* e relaxometria dos cérebros *in situ* encontrados neste trabalho são próximos dos reportados pela literatura (LANGKAMMER et al., 2010, 2012). Todavia, trabalhos mais completos com valores de susceptibilidade de ambas as condições ainda não têm sido reportados pela literatura e torna esta tese muito relevante para compreender as bases do contraste dos mapas de susceptibilidade atualmente obtidos. Valores de relaxometria de cérebro *ex situ* também foram próximos dos apresentados na literatura (BIRKL et al., 2016; DAWE et al., 2009; HOUSE et al., 2007). Uma camada espessa amarelada foi

observada na borda dos cérebros devido ao processo de fixação, uma camada semelhante foi detectada nas imagens adquiridas e nos mapas (Figura 29 e 33).

Os valores de QSM, $R2^*$ e $R2$ *ex situ* foram em média menor (37%), maior (8%) e maior (35%) do que valores *in situ*, respectivamente. Recentemente, Birkl e colaboradores também relataram aumento dos valores de $R2^*$ (18%) e $R2$ (23%) de tecido cerebral *ex situ* (BIRKL et al., 2016). Não foi detectada, portanto, concentração de metal na solução de fixação inicial e após a fixação, sugerindo que as alterações nos valores de imagem de RM para o cérebro *ex situ* não foram devido às variações no conteúdo de metal. Em concordância com este achado, Bush e colaboradores não encontraram variação da concentração de metal até 1 ano em cérebros fixados (BUSH et al., 1995). Por outro lado, a fixação do tecido no formaldeído promove a ligação cruzada de proteína que gera a imobilização da proteína e das moléculas de água, gerando, consequentemente, aumento dos valores de relaxometria (BIRKL et al., 2016; DAWE et al., 2009). Birkl e colaboradores (2016) sugeriram que a água intersticial é parcialmente substituída por formalina (BIRKL et al., 2016), então poderia afetar a susceptibilidade do tecido. A segmentação das regiões cerebrais incluiu alguns vasos, sendo assim, sangue totalmente desoxigenado pode ser outra razão para o aumento dos valores de susceptibilidade *in situ*.

Figura 33: Mapa de R2, R2* and QSM para o sujeito *postmortem* 13 (cérebro *in situ* e *ex situ*) e sujeito *in vivo*.

A susceptibilidade e os valores de R2* dos tecidos dos núcleos da base foram altamente correlacionados entre eles ($R^2 > 0,80$) para ambas as condições de cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* (Figura 34-A), indicando que ambas as técnicas têm sensibilidade semelhante para estes tecidos. Sun et al. (2015) encontraram coeficientes de correlações análogos para o cérebro *in situ* ($R^2 = 0,88$ e coeficiente angular $\sim 4,4$ ppb/s⁻¹). Além disso, os valores de susceptibilidade e R2* foram linearmente correlacionados entre as condições (Figura 34-B-C), permitindo futuras extrapolações. No entanto, os valores de R2 não se correlacionaram entre as condições de *in situ* e *ex situ* (Figura 34-D), devido ao processo de fixação do tecido.

Figura 34: Valores de susceptibilidade versus valores de $R2^*$ para um cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* (A). Correlações entre ambas as condições para: Susceptibilidade (B), $R2^*$ (C) e R2 (D). Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais dos sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◄), globo pálido (■), putâmen (►), núcleo caudado (◆) e tálamo (●).

Os valores de QSM, $R2^*$ e R2 do cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* foram estatisticamente correlacionados apenas com o íon Fe^{+3} presente como nanopartícula de ferrihidrita nucleada na ferritina e o ferro total (Figura 35 e 36). Nenhuma correlação com Cu^{+2} pode ser encontrada, justificada pela alta concentração de ferro, pelo menos 10 vezes maior do que a de cobre (KREBS et al., 2014), nas regiões dos núcleos da base. Além disso, vimos no capítulo 4 que o íon Cu^{+2} não é a principal forma de cobre no tecido cerebral. Por outro lado, nenhuma correlação foi observada entre valores quantitativos de RM e concentração do íon Fe^{+3} presente como ferro isolado na ferritina ($g = 4,28$), indicando uma contribuição magnética diferente desse ferro em relação ao ferro nucleado na mesma proteína. Além disso, apenas a amplitude pico a pico do Fe^{+3} ($g = 2,0$) correlacionou-se com a sua respectiva concentração total de metal quantificada por ICP-MS ($R2 = 0,91$), sugerindo que Fe na forma nucleada é a principal forma de ferro nos núcleos da base.

Comparando os coeficientes angulares da Figura 35 para ambas as condições, a condição *ex situ* reduziu 33% para QSM, 29% para $R2^*$ e 17% para $R2$. Estas reduções ocorreram devido ao processo de fixação que alterou as propriedades físicas do tecido e deve ser considerado para quantificar a deposição de metal no cérebro *ex situ*. O coeficiente de determinação (R^2) foi quase constante e superior a 0,7 para QSM e $R2^*$ para ambas as condições, indicando fortes correlações entre essas variáveis e a concentração de ferro iônico. De outro modo, para os valores de $R2$ (Figura 35) foi observado uma redução significativa na condição *ex situ* ($R^2 = 0,40$) em comparação com cérebro *postmortem in situ* ($R^2 = 0,78$). Como esperado, o valor $R2$ é mais dependente da composição da água do que os valores $R2^*$ e QSM, e no tecido fixado a composição da água é alterada. A Figura 34-D confirma que apenas os valores de $R2$ não estão correlacionados entre cérebro *postmortem in situ* e *ex situ*. Portanto, a técnica $R2$ não é suficientemente sensível para quantificar a deposição de metal em tecido fixado.

Figura 35: Correlação dos valores de susceptibilidade relativa (A), $R2^*$ (B) e $R2$ (C) com a amplitude pico a pico dos picos de RPE de $g = 2,0$ (Fe^{+3}) para cérebro de *postmortem in situ* (preenchido) e *ex situ* (*fixed*) (vazio). A equação linear e o coeficiente de correlação foram inseridos em cada gráfico. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais do sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◀), globo pálido (■), putâmen (▶), núcleo caudado (◆) e tálamo (●).

Correlação linear entre os valores de QSM e relaxometria de cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* foi apenas significativa para ferro total (Figura 36) e não para outros metais. Em uma regressão linear com múltiplos termos (metais) para valores de susceptibilidade e $R2^*$ *in situ*, o ferro mostrou ser dominante (Tabela 14 e 15). Não aplicamos regressão linear múltipla para valores de $R2$, devido ao baixo coeficiente de correlação linear obtido para ferro isoladamente. Também não foi avaliado a regressão múltipla para valores de RM *ex situ* por apresentar resultados de regressão linear semelhante *in situ*. A correlação linear entre valores de $R2$ e concentração de ferro total de cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* mostrou correlação moderada ($R^2 < 0,50$) versus a forte correlação para $R2^*$ ($R^2 > 0,82$) e susceptibilidade ($R^2 > 0,79$) (Figura 36). Esses resultados estão de acordo com a literatura, que avaliou apenas o Fe nos tecidos cerebrais (LANGKAMMER et al., 2010, 2012; SUN et al., 2015; YAO et al., 2009; ZHENG et al., 2013). A susceptibilidade relativa do cérebro *postmortem in situ* dividida pela concentração de ferro total foi 0,71 ppb/ $\mu\text{gFe/g}$ de tecido húmido, diferente dos reportados previamente: 0,89 ppb/ $\mu\text{gFe/g}$ de tecido húmido (LANGKAMMER et al., 2012), 0,80 ppb/ $\mu\text{gFe/g}$ de tecido húmido (ZHENG et al., 2013). No entanto, Zheng e colaboradores tinham medido tecidos cerebrais fixados por apenas 6 horas. Estas taxas *in situ* são inferiores ao valor teórico considerando todo o ferro sobre ferritina 1,30 ppb/ $\mu\text{gFe/g}$ de tecido húmido (SCHENCK, 1992). Este valor teórico foi obtido por outros autores, removendo a influência da mielina e medindo os tecidos cerebrais *in vivo* versus deposição de ferro dependente com a idade (Schweser et al., 2011).

Tabela 14 Valores do coeficiente da regressão linear múltipla entre valor de susceptibilidade *in situ* e concentração dos seguintes metais: Zn, Al, Cu e Fe

Sujeito	Intersecção (ppb)	Coef. Ang. Zn (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Al (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Cu (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Fe (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	R^2
9	-13 $\pm$ 42	0.7 $\pm$ 3	-13 $\pm$ 16	-2 $\pm$ 3	0,8 $\pm$ 0.2	0,70
10	-33 $\pm$ 55	-0.8 $\pm$ 2	-16 $\pm$ 13	6 $\pm$ 2	0,7 $\pm$ 0.1	0,93
13	-55 $\pm$ 36	-0.3 $\pm$ 1	-28 $\pm$ 29	8 $\pm$ 3	0,7 $\pm$ 0.1	0,89

Tabela 15: Valores do coeficiente da regressão linear múltipla entre valor de $R2^*$ *ex situ* e concentração dos seguintes metais: Zn, Al, Cu e Fe

Sujeito	Intersecção (ppb)	Coef. Ang. Zn (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Al (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Cu (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	Coef. Ang. Fe (ppb/ $\mu\text{g/g}$)	R^2
9	13 $\pm$ 7	0,4 $\pm$ 0,5	-3 $\pm$ 3	0,5 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,03	0,76
10	0 $\pm$ 18	0,9 $\pm$ 0,6	-4 $\pm$ 4	0,6 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,02	0.81
13	7 $\pm$ 10	0,3 $\pm$ 0,3	-9 $\pm$ 8	0,6 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,02	0.81

Figura 36: Regressão linear entre os valores de QSM, $R2^*$ e $R2$ de cérebro *postmortem in situ* (preenchido) e *ex situ* (fixed) (vazio) com a concentração de ferro medido por ICP-MS. A equação linear e o coeficiente de correlação foram inseridos em cada gráfico. Os pontos experimentais dos gráficos indicam amostras cerebrais do sujeito 9 (vermelho), 10 (verde) e 13 (azul): substância negra (★), núcleo rubro (◀), globo pálido (■), putâmen (▶), núcleo caudado (◆), tálamo (●) e soluções de ferritina do objeto simulador (▼).

Além disso, a influência da composição tecidual sobre os valores de QSM referentes à concentração de ferro foi observada para os resultados de cérebro *ex situ*, que tiveram a taxa de susceptibilidade relativa pela concentração total de Fe reduzida (0,41 ppb/μgFe/g de tecido úmido). Luo e colaboradores (2014) mostraram que a fixação do tecido em formol pode gerar comportamento anisotrópico e, possivelmente, um valor médio de susceptibilidade reduzido. Os autores relataram que os nervos de ratos frescos e fixados tinham uma grande diferença na componente longitudinal da susceptibilidade magnética (LUO; HE; YABLONSKIY, 2014).

As taxas de relaxitividade $R2^*$ (0,15 s⁻¹/μgFe/g de tecido úmido) e $R2$ (0,014 s⁻¹/μgFe/g de tecido úmido) por concentração de ferro encontrada para cérebro *postmortem in situ* (Figura 36) foi diferente da reportada por Langkammer *et al.*, (2010)

e House *et al.*, (2007). Provavelmente, a sequência de aquisição de imagem e o método de ajuste exponencial usado explicam essa diferença. A condição *ex situ* mostrou redução da taxa de relaxividade para $R2^*$ ($0,11 \text{ s}^{-1}/\mu\text{gFe/g}$ de tecido úmido) e intenso para $R2$ ($0,008 \text{ s}^{-1}/\mu\text{gFe/g}$ de tecido úmido) (Figura 36). Esses resultados estão de acordo com outros autores que relataram aumento de $R2$ para hemisfério cerebral durante 60 dias (DAWE *et al.*, 2009), para cérebros de esclerose múltipla (SCHMIERER *et al.*, 2008) e para cérebro de animais (LEE *et al.*, 2012). Todos os autores sugeriram que o processo de ligação cruzada em proteínas é a principal causa do aumento das taxas de relaxação do tecido. Todas essas evidências sugerem que os valores $R2^*$ e $R2$ também podem estimar a concentração total de ferro via mapeamento de RM em ambas as condições. No entanto, a sensibilidade para quantificar o íon metálico foi maior no cérebro *postmortem in situ* e $R2$ foi menos preciso para a condição cerebral *ex situ*. Por outro lado, a condição *ex situ* não deve ser desconsiderada, porque os bancos cerebrais preservam, comumente, os cérebros em formalina e a quantificação de ferro destes pode ser realizada por meio de experimento RM usando técnicas QSM ou $R2^*$.

A principal limitação do presente estudo é o baixo número de amostras. O acesso ao cérebro *postmortem in situ* e imagens *ex situ* dos mesmos sujeitos sem artefatos é uma tarefa difícil. Felizmente, nossas correlações apresentaram coeficientes de correlação muito próximos entre os sujeitos *postmortem* sugerindo reprodutibilidade. Adicionalmente, futuros estudos em pacientes são necessários para melhor avaliação da sensibilidade e especificidade dos mapas QSM, $R2^*$ e $R2$ para quantificar ferro ou ferro férrico em diferentes doenças neurodegenerativas. Nesses casos, outras contribuições podem envolver edema e desmielinização, dois fatores que poderiam afetar os valores QSM, $R2^*$ e $R2$ de uma maneira diferente. Outra limitação técnica de nosso estudo é que as concentrações de íons e metais totais foram medidas em pequenas amostras, enquanto que os valores de ressonância magnética quantitativa foram medidos em regiões volumétricas 3D.

5.2.2 Objetos simuladores

O objeto simulador com diferentes soluções de ferritina apresentou alta correlação linear ($R^2 > 0,97$) entre valores de QSM, $R2^*$ e $R2$ com concentração de ferro (Figura 36 e Figura 37). O coeficiente angular da curva de correlação de valores

de susceptibilidade por concentração de ferro foi de 1,31 ppb/ $\mu\text{gFe/ml}$ (Figura 36), quase idêntico às previsões teóricas para depósito de ferro no tecido cerebral na proteína ferritina (SCHENCK, 1992). Zheng e colaboradores (2013) relataram menor valor de coeficiente angular (1,11 ppb/ $\mu\text{gFe/ml}$) em condições experimentais semelhantes, mas utilizando outro método para calcular os valores de susceptibilidade pelo ajuste de mínimos quadrados da fase simulada por dipolo direto com a fase estimada (NEELAVALLI et al., 2009). Os valores de relaxividade $r2^*$ e $r2$ para concentração de ferro das soluções de ferritina foram de 0,05 $\text{s}^{-1}/\mu\text{gFe/ml}$, 0,013 $\text{s}^{-1}/\mu\text{gFe/ml}$, respectivamente (Figura 37). A relaxividade $r2^*$ foi maior do que $r2$, como esperado, pois os valores de $R2^*$ são mais sensíveis à quantificação de ferro do que $R2$. Mas os valores de $R2$ foram também muito correlacionados com a concentração de ferro na ferritina, indicando ser sensível a quantificação de ferro.

Figura 37: Valores de relaxometria e susceptibilidade de diferentes concentrações de ferro presentes em solução de ferritina e água. (A) valores de $R2^*$ e $R2$ correlacionados com a concentração de ferro. (B) mapa de susceptibilidade do objeto simulador com diferentes concentrações de ferritina em água.

As soluções de *SPIONs* apresentaram relaxividade $r1$, $r2^*$ e taxa de susceptibilidade para concentração de ferro de 0,014 $\text{s}^{-1}/\mu\text{gFe/ml}$, 16,6 $\text{s}^{-1}/\mu\text{gFe/ml}$ e 3,0 ppb/ml, respectivamente (Figura 38 e Figura 40). A razão entre os valores de relaxividade ($r2^*/r1 = 1186$) indica *SPIONs* como um contraste negativo $T2^*$.

Figura 38: Valores de relaxometria e susceptibilidade de diferentes concentrações de ferro presentes em solução de *SPIONs* e água. (A) valores de $R1$ e $R2^*$ correlacionados com a concentração de ferro medida por *ICP-AOS*. (B) mapa de susceptibilidade do objeto simulador com diferentes concentrações de *SPIONs*.

5.2.3 Modelo animal

O mapa de *QSM* possibilitou estimar a distribuição da concentração de *SPIONs* no fígado de animais injetados (Figura 39).

Figura 39: Mapas de *QSM* do fígado (em ppm) sobrepostos em imagens de magnitude da sequência de Eco de Gradiente para diferentes animais.

Tendências lineares semelhantes entre valores de susceptibilidade e concentração de ferro foram observadas para o objeto simulador (coeficiente angular: 3,0 ppb/ $\mu gFe/g$) e para o fígado dos animais (coeficiente angular: 2,5 ppb/ $\mu gFe/g$) (Figura 40-A). Embora o coeficiente de correlação entre os valores de *QSM* e a concentração de ferro no fígado dos animais ($R^2 = 0,68$) foi menor em comparação com os resultados do objeto simulador ($R^2 = 0,99$). Uma possível fonte de erro é a

amostragem discreta da medição do *ICP-AES*, mais animais poderiam aumentar a acurácia do nosso resultado.

A Figura 40-B apresenta correlação entre valor $R2^*$ e concentração de ferro diferente para o objeto simulador (coeficiente angular: $16,6 \text{ s}^{-1}/\mu\text{gFe/g}$) e para o fígado dos animais (coeficiente angular: $0,82 \text{ s}^{-1}/\mu\text{gFe/g}$). Uma possível razão para a diferença entre o objeto simulador e a medida *in situ* é a fração celular internalizada na medida *in situ*, como descrito em um estudo *in vitro* previamente (GIRARD et al., 2012). Estes achados sugerem que o valor de susceptibilidade é mais independente do ambiente do que o valor de $R2^*$ para quantificar ferro de *SPIONs*. Portanto, o mapa QSM mostrou ser um contraste positivo e robusto para quantificação de ferro em fígados de ratos.

Figura 40: Valores de susceptibilidade relativa (A) e $R2^*$ (B) versus valor da concentração de ferro de solução de ferritina do objeto simulador e do fígado de animais. Os valores de ambos os eixos relativos aos valores do objeto simulador foram multiplicados por dez para melhor visualização no gráfico A. As equações lineares e os coeficientes de correlação quadrática foram inseridos no gráfico.

5.2.4 Dispositivo de corregristo automático

O dispositivo de corregristo automático apresentou uma semelhança qualitativa entre as imagens de RM e as fotos dos respectivos cortes (Figura 41). Alguns cortes apresentaram alguns sulcos e giros não correspondentes, mas não prejudicaram em geral a localização dos núcleos da base.

Figura 41: Corregistro automático entre imagens ponderadas em T1 *ex situ* e fotos de cortes do encéfalo em orientação coronal dos sujeitos *postmortem* 5-7.

Para o sujeito 7, foi corregistrado também a sua imagem *in vivo* com a *ex situ*, consequentemente com a foto do corte (Figura 42 e 43). Para isso, foi necessário utilizar a função padrão `Coregister:Est&Res` no programa Statistical Parametric Mapping (acessado em <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12>).

Figura 42: Corregistro automático entre imagens ponderadas em T1 *in vivo* (2 meses antes da morte), *ex situ* (fixado 8 meses depois da morte) e fotos de cortes do encéfalo em orientação coronal do sujeito *postmortem* 7 (Tabela 6).

Figura 43: Continuação da Figura 42.

Este dispositivo foi reutilizado em todos os casos e foi necessária somente gelatina (U\$ 2,00), sendo mínimo o custo do uso do dispositivo. O dispositivo mostrou acurácia para corrigir as imagens semelhante ao que já havia sido proposto pela literatura (ABSINTA et al., 2014). A realização de um corregristo o mais fidedigno entre as imagens de RM e as amostras caracterizadas é de extrema importância para correlação entre as medidas.

5.3 Conclusão

Essa tese reporta pela primeira vez a sensibilidade de mapas de RM de encéfalo em condição *in situ* e *ex situ* do mesmo sujeito *postmortem* para quantificar metais e seus respectivos íons paramagnéticos.

Mapas de QSM, $R2^*$ e $R2$ de cérebro *postmortem in situ* e *ex situ* mostraram ser sensíveis e específicos apenas para a concentração de ferro total e de íons paramagnéticos Fe^{+3} , como nanopartículas nucleadas na forma de ferrihidrita dentro da ferritina. Resultados que confirmam a hipótese teórica discutida no artigo de Schenck (2003) e valida os mapas de RM como ferramentas neuro-radiológicas consideráveis para o estudo de doenças neurodegenerativas que envolva acúmulo de ferro. Embora Cu^{+2} presente em ceruloplasmina tenha sido detectado por RPE e ICP-MS no capítulo 4, não foi observada correlação com os mapas quantitativos de RM.

Os mapas de RM *in situ* foram mais sensíveis para quantificar metais do que os mapas *ex situ*, permitindo uma melhor extrapolação dos resultados para a condição *in vivo*. Pois o efeito da fixação nos tecidos cerebrais causou uma dependência oposta para a concentração de metal. Indicando que as técnicas de RM são dependentes da composição do tecido e devem ser levadas em conta para futuras conclusões. Embora experimento com cérebro *in situ* tenha sido mais dispendioso e, em geral, com maior risco biológico, concluímos que a aquisição de imagens nesta condição permitiu extrapolar nossos achados para a condição *in vivo*. Ainda, destacamos que os resultados da condição *ex situ* é de extrema importância para trabalhos futuros que quantifiquem metais de encéfalos fixados e preservados em bancos de cérebros via mapas quantitativos de RM.

O mapa de susceptibilidade magnética mostrou ser mais independente da biodistribuição de *SPIONs* no tecido de camundongos e no objeto simulador do que o mapa $R2^*$.

Por último, foi projetado e construído um dispositivo de baixo custo para corregistrar automaticamente cortes anatômicos de encéfalo e imagens de RM. A construção do dispositivo foi descrita em detalhes para a sua reprodução em trabalhos futuros, porque até o momento havia somente outras alternativas dispendiosas.

Capítulo 6

6 Conclusões, Limitações e Perspectivas Futuras

Os espectros de RPE de diferentes regiões cerebrais do núcleo da base e da substância branca e cinzenta do lobo parietal apresentaram quatro picos principais de ressonância de diferentes amplitudes. A comparação entre os espectros simulados de RPE e com os adquiridos permitiu identificar picos de ressonância referentes aos íons de Fe^{+3} nucleados e de sítios de nucleação (não nucleados) em ferritina ($g = 2,0$ e $g = 4,28$, respectivamente) e Cu^{+2} ($g_{\parallel} = 2,259$ e $g_{\perp} = 2,062$) em ceruloplasmina desnaturada.

Mapas de QSM, $R2^*$ e $R2$ de cérebro de *postmortem* controle *in situ* e *ex situ* foram sensíveis e específicos apenas para a concentração de ferro total e de íons paramagnéticos Fe^{+3} , como nanopartículas nucleadas na forma de ferrihidrita na ferritina. Embora Cu^{+2} presente em ceruloplasmina tenha sido detectado por RPE e ICP-MS, não foi observada correlação com os mapas quantitativos de ressonância magnética. Nossos resultados *postmortem* confirmam a hipótese teórica de que os valores dos mapas QSM, $R2^*$ e $R2$ estão mais fortemente correlacionados com o Fe^{+3} depositado na proteína ferritina do que com outros metais e respectivos íons.

Os mapas de RM *postmortem in situ* apresentaram um contraste muito mais próximo à condição *in vivo* do que a *ex situ*, com exceção das veias e artérias *in situ* que apresentaram sangue desoxigenado com propriedade paramagnética relevante. Sugerimos que a causa da mudança nos mapas de RM *ex situ* foi principalmente devido ao efeito de fixação em formaldeído, o qual promove a ligação cruzada de proteínas que gera a imobilização das mesmas e das moléculas de água. Além disso água intersticial é parcialmente substituída por formalina, então poderia afetar também a susceptibilidade do tecido. Nosso estudo com animais injetados com nanopartículas superparamagnéticas mostrou que a susceptibilidade magnética é mais independente da biodistribuição do que a relaxometria $R2^*$.

A principal limitação do presente estudo foi o pequeno número de amostras que foram avaliadas em ambas as condições *in situ* e *ex situ*. A aquisição de imagens de ressonância de cérebro *in situ*, dentro do cadáver, foi o limitante para não conseguirmos mais sujeitos. Felizmente, os coeficientes de correlação linear nos sujeitos *postmortem in situ* e *ex situ* foram bastante próximos, sugerindo uma alta reprodutibilidade. Estudos futuros em pacientes são necessários para melhorar a avaliação da sensibilidade e especificidade dos mapas QSM, $R2^*$ e R2 em termos de quantificação de ferro ou ferro férrico em diferentes doenças neurodegenerativas. Nestes casos, outras contribuições podem envolver edema e desmielinização, dois fatores que podem afetar os valores QSM, $R2^*$ e R2 de diferentes maneiras. Mais experimentos com pacientes não foi possível devido à dificuldade em conseguir casos nos hospitais em que foram feitas as colaborações. Nos experimentos futuros envolvendo pacientes, propomos a utilização de equipamento de RM de maiores campos como 7T para adquirir mapas quantitativos de RM com maior sensibilidade e acurácia, para detectar, se possíveis, pequenas diferenças.

O experimento de RPE em baixa temperatura utilizando dewar preenchido com nitrogênio líquido não permitiu avaliarmos a linha larga do espectro da ferritina dos tecidos cerebrais. O equipamento utilizado estava com problemas técnicos para utilizar o fluxo de gás de nitrogênio ao invés de usar o dewar. Propomos como trabalho futuro o estudo do espectro de RPE de tecidos cerebrais em diferentes temperaturas para avaliar as características paramagnéticas dos metais presentes. Outra limitação técnica do nosso estudo é que medimos as concentrações dos íons paramagnéticos e de metal em pequenas amostras, enquanto que os valores de ressonância magnética quantitativa foram avaliados em volume de estrutura 3D total. Logo, propomos quantificar por técnicas de RM e RPE a região cerebral com várias regiões menores até obter a região completa. Também uma limitação foi a quantificação da concentração de íons paramagnéticos via amplitude pico a pico ao invés da área da integral do espectro de RPE como é mais recomendado. Pois, como as amostras cerebrais apresentaram picos de ressonância muito próximos foi observado muitos erros na integral do sinal e posterior quantificação da área e assim optamos pela quantificação da amplitude pico a pico. Por último, seria importante estudar como ocorre a mudança química nos tecidos cerebrais fixados e o impacto no espectro de RPE das metaloproteínas.

Os trabalhos apresentados em congresso, os artigos em preparação e publicados resultantes dessa tese são descritos abaixo.

Resumos de congresso

- 1- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Antônio Carlos Santos, José Pittella, Luciano Serafini, Oswaldo Baffa Filho, e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Paramagnetic ions and R2 and R2*map of postmortem brain study. XXII Meeting of *ISMRM*, Milão-Itália - 2014.
- 2- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa** e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Paramagnetic ions, R2* and QSM map of postmortem brain study. I Transatlantic Workshop on Methods for Multimodal Neuroscience Studies, São Pedro, Brasil - 2014.
- 3- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Rafael Emidio Silva, Maria Concepción García Otaduy, Maria da Graça Martim, Edson Amaro Junior e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Quantitative susceptibility mapping of postmortem in situ and ex situ fixed. I LABMAN, São Paulo, Brasil - 2015.
- 4- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Rafael Emidio Silva, Maria Concepción García Otaduy, Edson Amaro Junior e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Quantitative susceptibility mapping *in vivo* and post-mortem. 2nd Brain Congress, Campinas - Brasil - 2015.
- 5- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Paulo Loureiro de Sousa, Carlos E. G. Salmon, Mathieu D. Santin, Daniel R. Roquet, Nathalie Philippi, Catherine Martin-Hunyadi, Benjamin Cretin e Frédéric Blanc. Évaluation des méthodes d'imagerie quantitative de la susceptibilité magnétique et relaxométrie R2* pour la caractérisation de la démence à corps de Lewy et de la maladie d'Alzheimer au stade précoce - SFRMBM, França - 2015.
- 6- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Rafael Emidio, Ana Tereza Di Lorenzo Alho, Camila Nascimento, Alexandre Silva, Maria Concepción García Otaduy, Maria da Graça Martim, Edson Amaro, Oswaldo Baffa, e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Correlation between paramagnetic ions and quantitative susceptibility values of postmortem brain study - XXIII Meeting of *ISMRM*, #6096 - Toronto - Canada - 2015.
- 7- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Imen Miladi, Patrick Poulet, Kofi Mawuli Deh, Yi Wang e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Quantification of Dendronized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Rat Liver Using Quantitative

Susceptibility Mapping. Apresentação pôster eletrônico no Congresso da sociedade Internacional de Ressonância Magnética em Medicina (sigla em inglês *ISMRM*) # 1964 – Havaí - 2017 e será escrito em forma de artigo após o evento.

- 8- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa**, Rafael Emidio, Ana Tereza Di Lorenzo Alho, Maria Concepción García Otaduy, Edson Amaro, Fernando Barbosa Junior, Oswaldo Baffa, e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Paramagnetic ions quantification using QSM and EPR in human brain. Apresentação pôster eletrônico no Congresso da sociedade Internacional de Ressonância Magnética em Medicina (sigla em inglês *ISMRM*): # 3650 – Havaí - 2017

Artigos

- 1- Device to registrate automatically pathological cut with postmortem magnetic resonance imaging. Em preparação para ser submetido na revista **Journal of Forensic Radiology and Imaging**.
- 2- Quantification of Dendronized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Rat Liver Using Quantitative Susceptibility Mapping. Em preparação para ser submetido na revista **NMR in Biomedicine**.
- 3- **Jeam Haroldo Oliveira Barbosa** Rafael Emídio, Ana Tereza Di Lorenzo Alho, Maria Conception Garcia Otaduy, Edson Amaro Junior, Fernando Barbosa Júnior, Oswaldo Baffa e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Quantifying paramagnetic ions in the brain with magnetic resonance techniques. Será re-submetido na revista **Magnetic Resonance in Medicine**.
- 4- Jeam Haroldo Oliveira Barbosa, Antonio Carlos Santos e Carlos Ernesto Garrido Salmon. Susceptibility weighted imaging: differentiating between calcification and hemosiderin. **Radiologia Brasileira**, v. 48, p. 93-100, 2015.

Referências

- AASA, R. Powder line shapes in the electron paramagnetic resonance spectra of high-spin ferric complexes. **The Journal of Chemical Physics**, v. 52, n. 8, p. 3919, 1970.
- ABSINTA, M. et al. Postmortem Magnetic Resonance Imaging to Guide the Pathologic Cut. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 73, n. 8, p. 780–788, ago. 2014.
- AIME, S. et al. EPR investigations of the iron domain in neuromelanin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1361, n. 1, p. 49–58, 10 jul. 1997.
- ANDRÁSI, E. et al. Several methods to determine heavy metals in the human brain. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**, v. 54, p. 819–825, 1999.
- ANDREWS, N. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, 1999.
- BARBOSA, J. H. O. **Quantificação da deposição de ferro no cérebro usando ressonância magnética: um estudo em pacientes com doença de Parkinson**. [s.l.] Dissertação Mestrado, 72p, Universidade de São Paulo, 2013.
- BARBOSA, J. H. O. et al. Quantifying Brain Iron Deposition in Patients with Parkinson's Disease Using Quantitative Susceptibility Mapping, R2 and R2*. **Magnetic Resonance Imaging**, 2015.
- BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, p. 23–29, 2009.
- BEARD, J. L.; CONNOR, J. R.; JONES, B. C. Iron in the Brain. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 6, p. 157–170, 27 abr. 1993.
- BERLINER, L. J. The evolution of biomedical EPR (ESR). **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 5, n. 1, p. 5–26, 5 jan. 2016.
- BIRKL, C. et al. Effects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. **NMR in Biomedicine**, v. 29, n. 4, p. 458–465, abr. 2016.
- BOTTINO, C. M. C. et al. Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. **International psychogeriatrics / IPA**, v. 14, n. 1, p. 59–72, mar. 2002.
- BROOKS, D. J. et al. Does signal-attenuation on high-field T2-weighted MRI of the brain reflect regional cerebral iron deposition? Observations on the relationship between regional cerebral water proton T2 values and iron levels. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 108–111, 1989.
- BUSH, V. J. et al. Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 284–294, 1995.
- CARNEIRO, A. A. O. **Sistema para medidas da magnetização remanente intragástrica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.
- CASTNER, T. et al. Note on the Paramagnetic Resonance of Iron in Glass. **The Journal of Chemical Physics**, v. 32, n. 3, p. 668, 1960.

- CATTANI, M. M. **Estudo por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em grãos e farináceos irradiados com 60Co**. [s.l.] Dissertação, 90 páginas, Universidade de São Paulo, 1995.
- CHANG, S. et al. Quantitative Susceptibility Mapping of Intracerebral Hemorrhages at Various Stages. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 44, n. 2, p. 420–425, ago. 2016.
- CHASTEEN, N. D.; HARRISON, P. M. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. **Journal of Structural Biology**, v. 126, n. 3, p. 182–194, jun. 1999.
- CHEN, J. C. et al. MR of human postmortem brain tissue: correlative study between T2 and assays of iron and ferritin in Parkinson and Huntington disease. **American journal of neuroradiology**, v. 14, n. 2, p. 275–81, 1989.
- CHEN, J.; HARDY, P. MR of human postmortem brain tissue: correlative study between T2 and assays of iron and ferritin in Parkinson and Huntington disease. **American journal Neuroradiol**, v. 14, n. 2, p. 275–281, 1993.
- CHEN, W. et al. Intracranial calcifications and hemorrhages: characterization with quantitative susceptibility mapping. **Radiology**, v. 270, p. 496–505, 2014.
- CORNETT, C. R.; MARKESBERY, W. R.; EHMANN, W. D. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. **Neurotoxicology**, v. 19, p. 339–345, 1998.
- CORRIGAN, F. M.; REYNOLDS, G. P.; WARD, N. I. Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer's disease. **Biometals**, v. 6, p. 149–154, 1993.
- COSTA FILHO, A. J. **Estudos da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase por EPR convencional e da estrutura dinâmica de biomembranas por EPR pulsada bidimensional**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.
- COSTA-FILHO, A. J. DA. **Interações magnéticas em sais de (Cobre-Dipeptídeos): Cu²⁺:GLY-Trp e Cu²⁺:Trp-Gly**. [s.l.] Dissertação, 122 páginas, Universidade de São Paulo, 1997.
- CRICHTON, R. **Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism**. 2nd. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- CRICHTON, R. R.; DEXTER, D. T.; WARD, R. J. Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 118, n. 3, p. 301–14, mar. 2011.
- DAWE, R. J. et al. Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 61, p. 810–818, 2009.
- DE ROCHEFORT, L. et al. Quantitative MR susceptibility mapping using piece wise constant regularized inversion of the magnetic field. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 60, n. 4, p. 1003–1009, out. 2008.
- DE ROCHEFORT, L. et al. Quantitative susceptibility map reconstruction from MR phase data using bayesian regularization: validation and application to brain imaging. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 63, n. 1, p. 194–206, jan. 2010.
- DEIBEL, M.; EHMANN, W.; MARKESBERY, W. Copper, iron, and zinc imbalances in

severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress. **J Neurol Sci.**, v. 143, n. 1–2, p. 137–42, 1996.

DEISTUNG, A. et al. Quantitative susceptibility mapping differentiates between blood depositions and calcifications in patients with glioblastoma. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57924, jan. 2013.

DEXTER, D. et al. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. **Lancet**, v. 2, n. 8569, p. 1219–20, 21 nov. 1987.

DEXTER, D. et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain : a journal of neurology**, v. 114, p. 1953–75, ago. 1991.

DEXTER, D. T. et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1830–6, jun. 1989.

DONG, J. et al. Simultaneous phase unwrapping and removal of chemical shift (SPURS) using graph cuts: application in quantitative susceptibility mapping. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 34, n. 2, p. 531–40, fev. 2015.

DRAYER, B. et al. MRI of brain iron. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 147, n. 1, p. 103–10, jul. 1986a.

DRAYER, B. et al. MRI of brain iron. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 147, n. 1, p. 103–10, jul. 1986b.

DU, G. et al. Quantitative susceptibility mapping of the midbrain in Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 31, n. 3, p. 317–24, mar. 2016.

DUFLOU, H.; MAENHAUT, W.; DE REUCK, J. Regional distribution of potassium, calcium, and six trace elements in normal human brain. **Neurochemical Research**, v. 14, p. 1099–1112, 1989.

DUYN, J. H. et al. High field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 28, p. 11796–801, 10 jul. 2007.

EHMANN, W.; MARKESBERY, W. Trace elements in human brain tissue by INAA. **J. Radioanal. Chem**, v. 70, p. 57–65, 1982.

EHMANN, W.; MARKSBERY, W.; ALAUDDIN, M. Quantitation, localization, and variations of brain zinc with aging by instrumental neutron activation analysis. In: CJ, F.; GA, H.; EJ, K. (Eds.). **Neurobiology of Zinc, Part A: Physiology, Anatomy and Techniques**. New York: Alan R Liss, Inc., 1984. p. 329–342.

FERNANDEZ, L. L.; BARBOSA, L. H. T.; SCHRODER, M. V., N. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 218–224, 2007.

GELMAN, N. et al. MR imaging of human brain at 3.0 T: preliminary report on transverse relaxation rates and relation to estimated iron content. **Neuroradiology**, v. 210, n. 3, p. 759–67, mar. 1999.

GHUGRE, N. R. et al. Mechanisms of tissue-iron relaxivity: nuclear magnetic resonance studies of human liver biopsy specimens. **Magnetic resonance in**

medicine, v. 54, n. 5, p. 1185–93, nov. 2005.

GIRARD, O. M. et al. Toward absolute quantification of iron oxide nanoparticles as well as cell internalized fraction using multiparametric MRI. **Contrast media & molecular imaging**, v. 7, n. 4, p. 411–7, 2012.

GRIFFITHS, P. D. et al. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vitro study using extended X ray absorption fine structure and cryo electron microscopy. **Brain**, v. 122, p. 667–73, abr. 1999.

HAACKE, E. M. et al. Susceptibility weighted imaging (SWI). **Magnetic resonance in medicine**, v. 52, n. 3, p. 612–8, set. 2004.

HAACKE, E. M. et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. **Magnetic resonance imaging**, v. 23, n. 1, p. 1–25, jan. 2005.

HAACKE, E. M. et al. Susceptibility mapping as a means to visualize veins and quantify oxygen saturation. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 32, n. 3, p. 663–76, set. 2010.

HAACKE, E. M. et al. **Magnetic Resonance Imaging**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2014.

HAACKE, E. M. et al. Quantitative susceptibility mapping: current status and future directions. **Magnetic resonance imaging**, v. 33, n. 1, p. 1–25, jan. 2015.

HAACKE, E.; REICHENBACH, J. R. **Susceptibility Weighted Imaging in MRI: Basic Concepts and Clinical Applications**. [s.l.] John Wiley and Sons, 2011.

HALLGREN, B.; SOURANDER, P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 3, n. 1, p. 41–51, out. 1958.

HARRISON, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1275, n. 3, p. 161–203, 1996.

HEBBRECHT, G.; MAENHAUT, W.; REUCK, J. DE. Brain trace elements and aging. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 150, n. 1–4, p. 208–213, 1999.

HIEFTJE, G. M.; NORMAN, L. A. Plasma source mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, p. 519–573, 1992.

HOUSE, M. J. et al. Correlation of proton transverse relaxation rates (R2) with iron concentrations in postmortem brain tissue from alzheimer's disease patients. **Magnetic resonance in medicine**, v. 57, n. 1, p. 172–80, jan. 2007.

JENSEN, J. Tissue Iron Detection & Quantification with MRI. **Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.** 19, 2011.

KAIM, W.; RALL, J. Copper—A“Modern” Bioelement. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 35, n. 1, p. 43–60, 19 jan. 1996.

KORNHUBER, J. et al. Iron, copper, zinc, magnesium, and calcium in postmortem brain tissue from schizophrenic patients. **Biological Psychiatry**, v. 36, p. 31–34, 1994.

KREBS, N. et al. Assessment of trace elements in human brain using inductively

coupled plasma mass spectrometry. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 28, n. 1, p. 1–7, jan. 2014.

KRESSLER, B. et al. Nonlinear regularization for per voxel estimation of magnetic susceptibility distributions from MRI field maps. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 29, n. 2, p. 273–81, fev. 2010.

KUBIAK, T.; KRZYMINIEWSKI, R.; DOBOSZ, B. EPR Study of Paramagnetic Centers in Human Blood. **Current Topics in Biophysics**, v. 36, n. 1, 1 jan. 2013.

KUMAR, P. et al. A novel approach to quantify different iron forms in ex-vivo human brain tissue. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38916, 12 dez. 2016.

LANGKAMMER, C. et al. Quantitative MR imaging of brain iron: a postmortem validation study. **Radiology**, v. 257, n. 2, p. 455–62, nov. 2010.

LANGKAMMER, C. et al. Quantitative susceptibility mapping (QSM) as a means to measure brain iron? A post mortem validation study. **NeuroImage**, v. 62, n. 3, p. 1593–1599, 24 maio 2012.

LANGKAMMER, C. et al. Quantitative susceptibility mapping in multiple sclerosis. **Radiology**, v. 267, n. 2, p. 551–9, maio 2013.

LEE, J. et al. The contribution of myelin to magnetic susceptibility-weighted contrasts in high-field MRI of the brain. **NeuroImage**, v. 59, n. 4, p. 3967–75, 15 fev. 2012.

LEWIN, A.; MOORE, G. R.; LE BRUN, N. E. Formation of protein-coated iron minerals. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, n. 22, p. 3597–610, 21 nov. 2005.

LILL, R.; MÜHLENHOFF, U. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 457–86, jan. 2006.

LINGE, K. L.; JARVIS, K. E. Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v. 33, n. 4, p. 445–467, dez. 2009.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of bioinorganic chemistry**. Mill Valley, California: University Science Books, 1994.

LIU, T. et al. Calculation of susceptibility through multiple orientation sampling (COSMOS): a method for conditioning the inverse problem from measured magnetic field map to susceptibility source image in MRI. **Magnetic resonance in medicine**, v. 61, n. 1, p. 196–204, jan. 2009.

LIU, T. et al. Unambiguous identification of superparamagnetic iron oxide particles through quantitative susceptibility mapping of the nonlinear response to magnetic fields. **Magnetic resonance imaging**, v. 28, n. 9, p. 1383–9, nov. 2010.

LIU, T. et al. Morphology enabled dipole inversion (MEDI) from a single-angle acquisition: comparison with COSMOS in human brain imaging. **Magnetic resonance in medicine**, v. 66, n. 3, p. 777–83, set. 2011.

LIU, T. et al. Nonlinear formulation of the magnetic field to source relationship for robust quantitative susceptibility mapping. **Magnetic resonance in medicine**, v. 69, n. 2, p. 467–76, fev. 2013.

- LIU, Z. et al. Preconditioned total field inversion (TFI) method for quantitative susceptibility mapping. **Magnetic resonance in medicine**, 28 jul. 2016.
- LUO, J.; HE, X.; YABLONSKIY, D. A. Magnetic susceptibility induced white matter MR signal frequency shifts-experimental comparison between Lorentzian sphere and generalized Lorentzian approaches. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 71, n. 3, p. 1251–1263, mar. 2014.
- LUTSENKO, S.; BHATTACHARJEE, A.; HUBBARD, A. L. Copper handling machinery of the brain. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 2, n. 9, p. 596–608, set. 2010.
- MACKAY, A. et al. In vivo visualization of myelin water in brain by magnetic resonance. **Magnetic resonance in medicine**, v. 31, n. 6, p. 673–7, jun. 1994.
- MAI, J. et al. **Atlas of the human brain**. 3ed. ed. New York: Elsevier, 2008.
- MALMSTRÖM, B. G.; VÄNNGÅRD, T. Electron spin resonance of copper proteins and some model complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 2, n. 2, p. 118–124, jun. 1960.
- MARKESBERY, W. R. et al. Brain trace element concentrations in aging. **Neurobiology of Aging**, v. 5, p. 19–28, 1984.
- MARQUES, J. P. P.; BOWTELL, R. Application of a Fourier based method for rapid calculation of field inhomogeneity due to spatial variation of magnetic susceptibility. **Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering**, v. 25B, n. 1, p. 65–78, abr. 2005.
- MAZIERO, D. **Localização e estudo de fontes epileptogênicas em pacientes de epilepsia focal em fase pré-operatória**. [s.l.] Tese de Doutorado, 128p, Universidade de São Paulo, 2016.
- MCDERMOTT, J. R. et al. Brain aluminum in aging and Alzheimer disease. **Neurology**, v. 29, p. 809–814, 1979.
- MORA, J. et al. Liquid-sample introduction in plasma spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 123–132, mar. 2003.
- MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E. et al. Electron paramagnetic resonance studies of human liver tissues. **Applied Magnetic Resonance**, v. 24, n. 3–4, p. 429–435, set. 2003.
- MURAKAMI, Y. et al. Usefulness of quantitative susceptibility mapping for the diagnosis of Parkinson disease. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 36, n. 6, p. 1102–8, jun. 2015.
- NEELAVALLI, J. et al. Removing background phase variations in susceptibility-weighted imaging using a fast, forward-field calculation. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 29, n. 4, p. 937–48, abr. 2009.
- NÚÑEZ, M. T. et al. Iron toxicity in neurodegeneration. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 25, n. 4, p. 761–76, ago. 2012.
- OGAWA, S. et al. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 14, n. 1, p.

68–78, abr. 1990.

PEI, M. et al. Algorithm for fast monoexponential fitting based on Auto-Regression on Linear Operations (ARLO) of data. **Magnetic resonance in medicine**, v. 73, n. 2, p. 843–50, fev. 2015.

PELL, G. S. et al. Optimized clinical T2 relaxometry with a standard CPMG sequence. **Journal of magnetic resonance imaging**, v. 23, n. 2, p. 248–52, fev. 2006.

RIEDERER, P. et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. **Journal of neurochemistry**, v. 52, n. 2, p. 515–20, fev. 1989.

RIEDERER, P.; YODIM, M. (EDS.). **Iron in central nervous system disorders**. Vienna: Springer, 1993.

ROIDER, G.; DRASCH, G. Concentration of aluminum in human tissues: investigations on an occupationally non-exposed population in Southern Bavaria (Germany). **Trace elements and electrolytes**, v. 16, n. 2, p. 77–86, 1999.

ROUAULT, T. A; TONG, W.-H. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 345–51, abr. 2005.

RUBINO, J. T.; FRANZ, K. J. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 129–43, fev. 2012.

SAIKI, M. et al. Trace element concentration differences in regions of human brain by INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 296, n. 1, p. 267–272, 17 abr. 2013.

SAINI, S. et al. Magnetism: a primer and review. **American journal of roentgenology**, v. 150, n. 4, p. 735–43, maio 1988.

SAINT'PIERRE, T. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais traço em álcool combustível e gasolina por espectrometrias de absorção atômica e de massa com plasma indutivamente acoplado**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SAITO K, ET AL. Dynamics of trace and ultra-trace elements in the brain. In: K, S. (Ed.). **Dynamics of Trace Elements in Human Body and Diseases**. [s.l.] Hokkaido University Medical Library Series, 1994. p. 11–17.

SCHEIBER, I. F.; DRINGEN, R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 556–65, abr. 2013.

SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. B.; DRINGEN, R. Metabolism and functions of copper in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 116, p. 33–57, maio 2014.

SCHENCK, J. F. Health and Physiological Effects of Human Exposure to Whole Body Four Tesla Magnetic Fields during MRI. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 649, p. 285–301, 1992.

SCHENCK, J. F. The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: MRI magnetic compatibility of the first and second kinds. **Medical Physics**, v. 23, n. 6, p. 815–850, 1996.

SCHENCK, J. F. J. Magnetic resonance imaging of brain iron. **Journal of the neurological sciences**, v. 207, n. 1–2, p. 99–102, 15 mar. 2003.

SCHMIERER, K. et al. Quantitative magnetic resonance of postmortem multiple sclerosis brain before and after fixation. **Magnetic resonance in medicine**, v. 59, n. 2, p. 268–77, fev. 2008.

SCHWESER, F. et al. **Is iron the source of post mortem susceptibility contrast in the brain?** Intl. Soc. Mag. Reson. Med. **Anais...** Montréal, Québec, Canada: 2011a

SCHWESER, F. et al. Quantitative imaging of intrinsic magnetic tissue properties using MRI signal phase : An approach to in vivo brain iron metabolism? **NeuroImage**, v. 54, n. 4, p. 2789–2807, 14 fev. 2011b.

SENSI, S. L. et al. The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16076–16085, 9 nov. 2011.

SHIMA, T. et al. Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 1, p. 110–119, 1997.

SHMUELI, K. et al. Magnetic susceptibility mapping of brain tissue in vivo using MRI phase data. **Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine**, v. 62, n. 6, p. 1510–22, dez. 2009.

SILVA, J. J. R. F. D.; WILLIAMS, R. J. P. **The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life**. 2nd. ed. Oxford, New York: : Oxford University Press, 2001.

SMITH, S. M. Fast robust automated brain extraction. **Human brain mapping**, v. 17, n. 3, p. 143–55, nov. 2002.

SOFIC, E. et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **Journal of neural transmission**, v. 74, n. 3, p. 199–205, jan. 1988.

SOFIC, E. et al. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. **Journal of neurochemistry**, v. 56, n. 3, p. 978–82, mar. 1991.

SPATZ, H. Uber Den Eisennachweis im Gehrin, besonders in Zentren des extrapyramidal-motorischen systems. **Z Ges Neuronal Psychiat Berl**, p. 77:261, 1922.

SUN, H. et al. Validation of quantitative susceptibility mapping with Perls' iron staining for subcortical gray matter. **NeuroImage**, v. 105, p. 486–92, 15 jan. 2015.

TANDON, L. et al. RNAA for arsenic, cadmium, copper, and molybdenum in CNS tissues from subjects with age-related neurodegenerative diseases. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles**, v. 179, n. 2, p. 331–339, abr. 1994.

THOMAS, L. O. et al. MR detection of brain iron. **American journal of neuroradiology**, v. 14, n. 5, p. 1043–8, 1993.

TIAN LIU et al. Accuracy of the Morphology Enabled Dipole Inversion (MEDI) Algorithm for Quantitative Susceptibility Mapping in MRI. **IEEE Transactions on Medical Imaging**, v. 31, n. 3, p. 816–824, mar. 2012.

- TOFTS, P. **Quantitative MRI of the Brain**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- TOMASI, D. et al. Use of a Phase Reference for Field Mapping with Amplitude Images at Low Field. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 131, n. 2, p. 310–314, abr. 1998.
- TRUONG-PHUOC, L. et al. Patent Blue Derivatized Dendronized Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 27, p. 4565–4571, set. 2015.
- UITTI, R. J. et al. Regional metal concentrations in Parkinson's disease, other chronic neurological diseases, and control brains. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 16, n. 3, p. 310–4, ago. 1989.
- ULE, G.; VÖLKL, A.; BERLET, H. Trace elements in human brain. II. Copper, zinc, calcium and magnesium of 13 brain areas compared to iron during the 4th to 8th life decade (author's transl). **Zeitschrift fur Neurologie**, v. 206, p. 117–128, 1974.
- VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 11, p. 789–802, 31 nov. 2008.
- VÖLKL, A.; BERLET, H.; ULE, G. Trace elements (Cu, Fe, Mg, Zn) of the brain during childhood. **Neuropadiatrie**, v. 5, p. 236–242, 1974.
- VYMAZAL, J. et al. The relation between brain iron and NMR relaxation times: an in vitro study. **Magnetic resonance in medicine**, v. 35, n. 1, p. 56–61, jan. 1996.
- WANG, Y.; LIU, T. Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding MRI data for a tissue magnetic biomarker. **Magnetic resonance in medicine**, v. 73, n. 1, p. 82–101, jan. 2015.
- WARD, N.; MASON, J. Neutron activation analysis techniques for identifying elemental status in Alzheimer's disease. **J Radioanalytical Nucl Chem**, v. 113, p. 515–526, 1987.
- WEIR, M. P.; PETERS, T. J.; GIBSON, J. F. Electron spin resonance studies of splenic ferritin and haemosiderin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 828, p. 298–305, 1985.
- WENDER, M. et al. The cerebral copper-protein complexes in hepato-lenticular degeneration studied by means of electron-spin-resonance technique. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 50, n. 6, p. 812–815, 29 jan. 1974.
- WHARTON, S.; BOWTELL, R. Whole brain susceptibility mapping at high field: a comparison of multiple and single orientation methods. **NeuroImage**, v. 53, n. 2, p. 515–525, 1 nov. 2010.
- WHARTON, S.; SCHAFER, A.; BOWTELL, R. Susceptibility mapping in the human brain using threshold based k space division. **Magnetic resonance in medicine**, v. 63, n. 5, p. 1292–304, maio 2010.
- WISNIEFF, C. et al. Quantitative susceptibility mapping (QSM) of white matter multiple sclerosis lesions: Interpreting positive susceptibility and the presence of iron. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 74, n. 2, p. 564–570, ago. 2015.
- WOOD, J. C.; GHUGRE, N. Magnetic resonance imaging assessment of excess iron

in thalassemia, sickle cell disease and other iron overload diseases. **Hemoglobin**, v. 32, n. 1–2, p. 85–96, jan. 2008.

XU, N. Brain aluminum in Alzheimer's disease using an improved GFAAS method. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 735–744, 1992.

YAO, B. et al. Susceptibility contrast in high field MRI of human brain as a function of tissue iron content. **NeuroImage**, v. 44, n. 4, p. 1259–66, 15 fev. 2009.

YASUI, M.; KIHARA, T.; OTA, K. Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 593–600, jan. 1992.

YUSHKEVICH, P. A. et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. **NeuroImage**, v. 31, n. 3, p. 1116–28, 1 jul. 2006.

ZATTA, P. **Metal Ions and Neurodegenerative Disorders**. [s.l.] World Scientific, 2003.

ZECCA, L. et al. Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. **Neuroscience**, v. 73, n. 2, p. 407–415, 1996.

ZECCA, L. et al. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1766–73, mar. 2001.

ZECCA, L.; SWARTZ, H. M. Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. **J Neural Transm**, v. 5, p. 203–213, 1993.

ZHANG, Y. et al. Lysosomal Proteolysis Is the Primary Degradation Pathway for Cytosolic Ferritin and Cytosolic Ferritin Degradation Is Necessary for Iron Exit. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 7, p. 999–1009, out. 2010.

ZHENG, W. et al. Measuring iron in the brain using quantitative susceptibility mapping and X-ray fluorescence imaging. **Neuroimage**, v. 78, p. 68–74, out. 2013.

Apêndice

Apêndice A- Termo de aceite do comitê de ética da FFCLRP-USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Campus de Ribeirão Preto

Of.CETP/FFCLRP-USP/001-vjmc

Ribeirão Preto, 23 de janeiro de 2014

Prezado Pesquisador,

Comunicamos a V. Sa. que o projeto de pesquisa intitulado
"VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS PARAMAGNÉTICOS NO CÉREBRO POR IMAGEM DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA" foi reanalisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
FFCLRP-USP, em sua 127ª Reunião Ordinária, realizada em 12.12.2013, e
enquadrado na categoria: **APROVADO** (CAAE n.º 20855413.2.0000.5407).

Solicitamos que eventuais modificações ou emendas ao projeto
de pesquisa sejam apresentadas ao CEP, de forma sucinta, identificando a parte do
projeto a ser modificada e suas justificativas, e que relatórios parciais e final sejam
entregues, via Plataforma Brasil, conforme os itens X.1.3.d e XI.2.d, da Res. CNS nº
466/2012.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª ANDRÉIA SCHMIDT
Coordenadora

Ao Senhor
Jeam Haroldo Oliveira Barbosa
Programa de Pós-Graduação Física e Matemática da FFCLRP USP

c/c:
Prof. Dr. Carlos Ernesto Garrido Salmon
Departamento de Física da FFCLRP USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP USP
Fone: (16) 3602-4811
Fax: (16) 3633-2660 (direto) ou 3633-5015
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 3 - sala 16 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: <http://www.ffclrp.usp.br> - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br

Apêndice B- Termo de aceite do comitê de ética do HCFM-USP **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/12/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa intitulado: **“CORRELAÇÃO ENTRE O SINAL DE IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA POST MORTEM E ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA IDADE E DEPOSIÇÃO DE FERRO”** apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: MARIA CONCEPCION GARCIA OTADUY

CEP-FMUSP, 09 de Dezembro de 2015.

Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice C- Termo de consentimento livre e esclarecido do comitê de ética do HCFM-USP

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☒ F ☒
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☒ F ☒
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA - **Correlação entre o sinal de imagem por ressonância magnética post mortem e achados histopatológicos: influência da idade e deposição de ferro.**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Concepción García Otaduy, PhD
CARGO/FUNÇÃO: Assistente de Pesquisa/Física
UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Radiologia
PESQUISADOR EXECUTANTE: Luiz Fernando Ferraz da Silva, MD, PhD CRM: 108298
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☒
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☒
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – v. 2.0a Março/2015

Muito obrigado por sua atenção.

Estamos realizando um estudo para melhorar as formas de medir alguns componentes químicos no cérebro que aumentam com a idade. Este estudo é muito importante e pode auxiliar a melhorar a forma como os médicos dão laudos de exames de ressonância magnética. Este trabalho também poderá, às vezes, ajudar a descobrir a causa de morte de seu parente. Tratamentos novos para muitas doenças só são descobertos fazendo estudos como este.

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

O(a) Senhor(a) será entrevistado por um enfermeiro (a) à respeito de seu parente que faleceu. As perguntas são simples, porém é importante que o(a) senhor(a) pense por dois minutos antes de responder e que seja o mais exato possível. Caso não saiba a resposta, diga "não sei". Durante a autópsia, a região do encéfalo do seu parente que faleceu será retirada e algumas regiões do cérebro serão analisadas com bastante cuidado para que, no futuro, possamos desenvolver formas mais precisas de avaliar os efeitos do envelhecimento utilizando imagens de ressonância magnética nas pessoas vivas.

Os resultados serão comparados com as respostas que o(a) senhor(a) respondeu. Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e o corpo não será mutilado.

O(A) senhor(a) não precisará voltar aqui novamente e este estudo não atrasará a realização da autópsia.

Qualquer dúvida que o(a) senhor(a) tenha será esclarecida pelos próprios médicos responsáveis pelo trabalho, os resultados estarão disponíveis somente a(o) senhor(a). A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode ser retirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas.

Uma cópia deste documento será entregue a(o) senhor(a)

O responsável pela pesquisa, em caso de dúvidas é:

Dra. Maria Concepción García Otaduy (Física)

Tel.: (011) 2661-7619

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 251 – 21º andar– sala 36; Fone/Fax: 3893-4401/4407; E-mail: cep.fm@usp.br

- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua

participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Correlação entre o sinal de imagem por ressonância magnética post mortem e achados histopatológicos: influência da idade e deposição de ferro".

Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____