

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO: BIOFÍSICA E FARMACOLOGIA

MIRELLA VISNOSVESCKI FOGAÇA

**Avaliação da biodistribuição de nanopartículas magnéticas em tecido hepático
afetado pelo estágio de cirrose**

BOTUCATU

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO: BIOFÍSICA E FARMACOLOGIA

MIRELLA VISNOSVESCKI FOGAÇA

**Avaliação da biodistribuição de nanopartículas magnéticas em tecido hepático
afetado pelo estado de cirrose**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do grau de Bacharel
em Física Médica, sob a orientação do Professor
Titular José Ricardo de Arruda Miranda e
coorientação do Dr. Guilherme Augusto Soares

BOTUCATU

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fogaça, Mirella Visnosvescki.

Avaliação da biodistribuição de nanopartículas magnéticas em tecido hepático afetado pelo estágio de cirrose / Mirella Visnosvescki Fogaça. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: Guilherme Augusto Soares

Capes: 10507132

1. Biomagnetismo. 2. Nanopartículas. 3. Cirrose hepática. 4. Fígado - Câncer.

Palavras-chave: Biodistribuição; Biomagnetismo; Hepatocarcinogênese; Nanopartículas .

Dedico esse trabalho a minha mãe e irmãos,
que sempre me apoiaram e acreditaram no
meu potencial quando até eu mesma duvidei.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador José Ricardo de Arruda Miranda, pela oportunidade de fazer parte do laboratório, cobranças e conhecimentos compartilhados, que me ensinaram demais.

Ao meu coorientador Dr. Guilherme Augusto Soares, pela paciência, conselhos e por toda ajuda oferecida, seja para o trabalho desenvolvido ou vida pessoal.

A minha mãe, que é a mulher mais esforçada e dedicada que já conheci, que nunca mediu esforços para me proporcionar o privilégio de uma educação de qualidade, sempre me apoiou e acreditou que eu conseguiria passar por qualquer dificuldade.

A minha querida e amada irmã, Gabriella, que é a pessoa mais doce e incrível que existe nesse mundo, que mesmo sem saber sempre me deu forças para continuar.

Aos meus esplêndidos amigos que Botucatu me proporcionou, o meu muito obrigada por tornarem os dias mais leves, pelos inúmeros conselhos e incentivos, com vocês aprendi a ser um ser humano melhor, meu muito obrigada para Beatriz, Paula, João Miguel, Isabella e à Nayara, Wilson e João Pedro, que mesmo não fazendo parte do meu dia a dia foram importantes.

Aos colegas de laboratório, João Miguel, Erick, Laís, Gustavo, Michael, Ana Vitória, Raissa, Gabriel e Yuri pela convivência e histórias, além de toda ajuda fornecida durante esses anos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido, essencial para o desenvolvimento do trabalho e para me manter na Unesp.

RESUMO

Nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido empregadas como sondas multifuncionais a fim de diagnosticar e tratar doenças hepáticas nos últimos anos. O sistema de Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) vem demonstrando resultados expressivos em quantificar NPMs. Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar como a condição de hepatocarcinogênese associada à cirrose altera a biodistribuição de NPMs no fígado a partir da quantificação e reconstrução de imagens da biodistribuição. Foram utilizados 36 ratos machos Wistars, com peso corporal entre 250 a 350 gramas, divididos em dois grupos tratado e controle. O grupo tratado foi submetido a um protocolo de indução de cirrose com injeções de Dietilnitrosamina (DEN) e Tioacetamida (TAA), em durante treze semanas. Após, foram submetidos à cirurgia de canulação da veia femural para administração intravenosa de NPMs (dose de 32 mg/kg) sob anestesia (99% uretano – 1,5 mg/kg). Foram utilizadas NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato ($\text{Cit-nFe}_2\text{O}_4$). Eutanasiados os animais, os fígados foram retirados e escaneados pelo sensor BAC monocanal, acoplado a mesa CNC automática para futura reconstrução de imagens estáticas da biodistribuição. Posteriormente foi realizada a quantificação das massas de NPMs em amostras de órgãos secas e homogeneizadas, a partir do sensor BAC cavidade. Assim, foi possível a reconstrução de imagens estáticas e obtenção de informações relevantes sobre a biodistribuição de NPMs no tecido. Evidenciou-se o prejuízo da função hepática mediante ao estágio cirrótico em virtude das inúmeras alterações vasculares acarretadas pela doença, que influenciam o fluxo sanguíneo e consequentemente o acúmulo de NPMs. Foi confirmado a eficiência do sistema BAC a fim de quantificar e reconstruir imagens de biodistribuição em tecidos biológicos.

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been employed as multifunctional probes to diagnose and treat liver diseases in recent years. The Alternating Current Biosusceptometry (ACB) system has shown significant results in quantifying NPMs. In view of this, the present work aims to evaluate how the condition of hepatocarcinogenesis associated with cirrhosis alters the biodistribution of MNPs in the liver from quantification and image reconstruction of biodistribution. We used 36 male Wistars rats, with body weight between 250 to 350 grams, divided into two groups, treated and control. The treated group was submitted to a cirrhosis induction protocol with injections of Diethylnitrosamine (DEN) and Thioacetamide (TAA) over a period of thirteen weeks. Afterwards, they underwent femoral vein cannulation surgery for intravenous administration of MNPs (32 mg/kg dose) under anesthesia (99% urethane - 1.5 mg/kg). Citrate-coated manganese ferrite MNPs (Cit-nFe₂O₄) were used. Euthanized the animals, the livers were removed and scanned by single-channel ACB sensor, coupled to automatic CNC table for future reconstruction of static images of biodistribution. Subsequently, quantification of MNPs masses in dried and homogenized organ samples was performed from the cavity ACB sensor. Thus, it was possible to reconstruct static images and obtain relevant information about the biodistribution of MNPs in the tissue. It was evidenced the impairment of liver function by cirrhotic stage due to numerous vascular changes caused by the disease, which influence the blood flow and consequently the accumulation of MNPs. The efficiency of the ACB system to quantify and reconstruct biodistribution images in biological tissues was confirmed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de indução de cirrose.	16
Figura 2 – Representação do diagrama funcional do sistema BAC.	17
Figura 3 – Arranjos de sensores BAC utilizados. (A) - Sensor monocal. (B) – Sensor BAC cavidade.....	18
Figura 4 - Representação do sensor BAC cavidade, ilustrando o ganho de sensibilidade concedido pela conformação.....	19
Figura 5 - Representação da mesa de varredura utilizada para o escaneamento do tecido.	20
Figura 6 - Representação da divisão anatômica dos lobos hepáticos para análise individual da biodistribuição em tecido hepático afetado por cirrose.	21
Figura 7 - Representação dos dados da biodistribuição de nanopartículas magnéticas em ambos os grupos experimentais.....	22
Figura 8 - Representação dos dados da biodistribuição individual dos lobos hepáticos das nanopartículas magnéticas em ambos os grupos experimentais.	23
Figura 9 - Imagens representativas do acúmulo de NPMs em fígados dos animais do grupo SAL.	24
Figura 10 - Imagens representativas do acúmulo de NPMs em fígados dos animais cirróticos do grupo DEN+TAA.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Modelo de experimentação.....	15
3.2. Protocolo de indução	15
3.3. Biosusceptometria AC	16
3.4. Nanopartículas magnéticas	18
3.5. Protocolo de experimentação animal para análises via BAC	18
3.5.1. Análises via BAC.....	19
3.6. Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS	21
4.1. Quantificação das nanopartículas magnéticas via sensor cavidade.....	21
4.1.1. Quantificação da biodistribuição de NPMs em órgãos de interesse	21
4.1.2. Quantificação individual da biodistribuição de NPMs em lobos hepáticos.....	22
4.2. Imageamento dos fígados via BAC monocal.....	23
4.2.1. Imagens estáticas dos fígados saudáveis.....	23
4.2.2. Imagens estáticas dos fígados lesionados	24
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia e a nanociência são áreas de pesquisa, com grande evolução e desenvolvimento, e que, recentemente, vêm se destacando com aplicações na área da saúde, a denominada nanomedicina (FONTES, 2019). Ela fundamenta-se do princípio de que, ao se manipular certos materiais em escala nanométrica, eles assemelham-se, em escala, às estruturas biológicas (KIM; RUKTA; CHAN, 2010). Desta forma, a nanomedicina se apresenta como importante promessa no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento no campo da oncologia (OLIVEIRA; DE SOUSA LIMA, 2021).

A perspectiva sobre nanomedicina tem ampliado consideravelmente nos últimos anos (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), o que proporcionou sua introdução em âmbitos clínicos (LEGGE; COLLEY; LAWSON; RAWLINGS *et al.*, 2019), demonstrando potencial em transpor desafios, ainda existentes, no diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças, fazendo uso de materiais nanoestruturados (MITCHELL; BILLINGSLEY; HALEY; WECHSLER *et al.*, 2021). Atributos importantes desses materiais, como tamanho exíguo, alta versatilidade e suas propriedades físico-químicas, que variam dependendo do tamanho da partícula, são importantes características a respeito do desenvolvimento de novos métodos terapêuticos (LEGGE; COLLEY; LAWSON; RAWLINGS *et al.*, 2019) e de diagnóstico convencionais (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Dentre as categorias de nanomateriais que vêm despertando interesse na comunidade científica, pontua-se as nanopartículas magnéticas (NPMs) (ZEINALI SEHRIG; MAJIDI; NIKZAMIR; NIKSAMIR *et al.*, 2016), estruturas que podem dispor de inúmeros tamanhos, entre 1 a 100 nanômetros, cujas características, como formato e composição, apresentam aplicações diversas (FADEEL; ALEXIOU, 2020), exibindo atrativo potencial terapêutico (CARDOSO; FRANCESKO; RIBEIRO; BAÑOBRE-LÓPEZ *et al.*, 2018), salienta-se seu emprego como mediador na hipertermia magnética (LEGGE; COLLEY; LAWSON; RAWLINGS *et al.*, 2019), atuação como vetores na entrega guiada de drogas (ASLAM; SHUKRULLAH; NAZ; FATIMA *et al.*, 2021), além de atuarem como agentes de contraste para Imageamento por Ressonância Magnética (IMR), técnica fundamentada na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em que os sinais de RMN adquiridos, particularmente provenientes do núcleo de átomos de hidrogênio, são codificados e geram uma imagem (GONÇALVES; RAMALHO, 2017).

A síntese das NPMs pode se suceder a partir de inúmeros compostos, como ouro, prata

e óxido de ferro (FRANTELLIZZI; CONTE; PONTICO; PANI *et al.*, 2020), em especial, as baseadas em óxido de ferro manifestam comportamento ferrimagnético e em situações de dimensões inferiores a 20 nanômetros, esse comportamento altera-se para o superparamagnético (BEDANTA; KLEEMANN, 2008), em âmbitos clínicos, o superparamagnetismo tem melhor serventia, sendo a magnetita superparamagnética (Fe_3O_4) o óxido mais usualmente utilizado, devido a boa biocompatibilidade e baixa toxicidade (ASSA; JAFARIZADEH-MALMIRI; AJAMEIN; ANARJAN *et al.*, 2016). Esse comportamento descreve uma veloz resposta quando a NPM é submetida a um campo magnético externo, demonstrando momento magnético característico, e analogamente ao comportamento ferromagnético (FRANTELLIZZI; CONTE; PONTICO; PANI *et al.*, 2020), não expressa magnetização remanente, por conseguinte, ao cessar a excitação advinda do campo magnético, as partículas retornam a sua orientação arbitrária, além disso, manifestam momento magnético coletivo nulo (BEDANTA; KLEEMANN, 2008). Devido a esses atributos, esses materiais classificam-se como SPIONs (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*).

Um componente fundamental na avaliação translacional de nanomedicamentos é a determinação de sua biodistribuição no organismo (ARMS; SMITH; FLYNN; PALMER *et al.*, 2018). Existem três métodos de detecção e quantificação em sistemas e tecidos biológicos, para análises da biodistribuição de NPMs. O primeiro método é baseado na detecção elementar desses materiais, como o ICP-MS (*Ion Coupled Plasma Mass Spectrometry*), que faz uso de plasma para ionização da amostra examinada e, por meio de seu espectrômetro de massa, divide e quantifica os íons presentes (WAGNER; SCHNORR; PILGRIMM; HAMM *et al.*, 2002). Em segundo, os métodos indiretos de detecção, via atividade radioativa, que, fazendo uso de traçadores magnéticos, detectam os materiais magnetizados (KUMAR; ROY; OHULCHANSKKY; VATHY *et al.*, 2010). Por fim, métodos de detecção direta, diante das propriedades magnéticas das partículas, demonstram alta resolução e sensibilidade, ademais, é o método mais almejado tratando-se de detecção e quantificação, pois não se faz uso de moléculas marcadoras rastreáveis nas NPMs, que eventualmente influenciam e interagem com o meio biológico (FARIA, 2020). Como exemplos de métodos diretos, podemos citar o MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) e o MPI (*Magnetic Particle Imaging*). O MRI é uma técnica de detecção direta que consiste em quantificar e detectar a desconformidade da resposta captada pela existência de NPMs nas vizinhanças do núcleo de hidrogênio, quando sujeitos a campo magnético externo ou ondas de radiofrequência (ARAMI; KHANDHAR; TOMITAKA; YU *et al.*, 2015); e o MPI, é um método que emprega campos magnéticos de corrente contínua com

objetivo de produzir uma região livre de campo, resultando na saturação magnética das partículas fora da região de relevância, e após, aplica um campo magnético alternada nessa mesma região saturada, detecta as NPMs utilizando da não linearidade de magnetização, através de bobinas fundamentadas na lei de indução de Faraday (LOEWA; WIEKHORST; GEMEINHARDT; EBERT *et al.*, 2012), entretanto ambas exibem alto custo, complexidade e necessidade de operarem em ambiente blindado magneticamente.

Ao serem administradas intravenosamente, as NPMs são especialmente capturados em tecidos com existência de macrófagos, como fígado e baço (ALPHANDÉRY, 2019) a depender de certos fatores físicos, como quantidade de dose injetada, tamanho e revestimento da partícula. Em torno de 30-99% das NPMs presentes na corrente sanguínea são apreendidas pelo tecido hepático (COLE; DAVID; WANG; GALBÁN *et al.*, 2011). O excesso de NPMs retidos nesse órgão e suas propriedades superparamagnéticas, após a injeção intravenosa, ampliam a capacidade da utilização desses materiais como agente de contraste (GONÇALVES; RAMALHO, 2017), a fim de ampliar a relação sinal-ruído, viabilizando modalidades de imageamento magnético para diagnóstico de patologias hepáticas (MAUREA; MAINENTI; TAMBASCO; IMBRIACO *et al.*, 2014).

O fígado desempenha funções fisiológicas essenciais (EZHILARASAN, 2021) englobando desde a produção e secreção de bile, metabolismo de carboidratos, equilíbrio hormonal e desintoxicação, reservatório de volume e filtro para o sangue, até a produção de fatores imunológicos para combater infecções (ZHANG; POON; TAVARES; MCGILVRAY *et al.*, 2016), ademais, é o principal centro de transformação de diversas drogas e xenobióticos (EZHILARASAN, 2021). Lóbulo hepático é o nome que se dá à unidade funcional desse sítio anatômico, estrutura de formato cilíndrico que possui alguns milímetros de comprimento, cerca de 50.000 a 100.000 lóbulos hepáticos estão presentes no fígado (HALL, 2021). São constituídos por inúmeras placas celulares com espessura de duas células, circundando e se irradiando para uma veia central (HALL, 2021).

A arquitetura hepática é separada em duas porções: (1) porção parenquimatosa, constituída por células biliares e células hepáticas, os hepatócitos, e (2) a porção não parenquimatosa, onde estão presentes células endoteliais sinusoidais (LSECs), células hepáticas estreladas em descanso (HSCs) e células de Kupffer (CKs), intitulados macrófagos residentes do fígado (SUN; KANG; LIU; ZHANG *et al.*, 2021), cerca de 80-90% dos macrófagos residentes do corpo humano encontram-se no fígado (ZHANG; POON; TAVARES; MCGILVRAY *et al.*, 2016). Os CKs são células especializadas na liberação de citocinas e

fagocitose, operam como linha primária de proteção imunológica do corpo humano (SOARES; PROSPERO; CALABRESI; RODRIGUES *et al.*, 2019), essas células interagem diretamente com as NPMs em virtude da vasculatura fenestrada hepática, os sinusoides hepáticos são cobertos pelas LSECs associadas com as CKs (BARTNECK; WARZECHA; TACK, 2014) e formam um revestimento contínuo dos capilares (ZHANG; POON; TAVARES; MCGILVRAY *et al.*, 2016).

O fígado demonstra alto fluxo sanguíneo e baixa resistência vascular, a cada minuto, cerca de 1.050 mililitros de sangue fluem da veia porta para os sinusoides hepáticos e outros 300 mililitros fluem a partir da artéria hepática, totalizando o equivalente a 27% do débito cardíaco (HALL, 2021). O tecido hepático revela notável capacidade regenerativa fim de reinstalar sua homeostase (HALL, 2021). Contudo, em casos de lesões persistentes, um mecanismo de cicatrização de feridas, em que há deposição de proteínas de matriz extracelular (MEC) no tecido afetado, conhecido como fibrose, é incitado (BARTNECK; WARZECHA; TACK, 2014). A alta proliferação de proteínas da MEC resultante em produção excessiva de tecido conjuntivo hepático, que prejudica as funcionalidades do fígado (TACKE; WEISKIRCHEN, 2021).

Grande parte dos distúrbios que afetam o fígado, inclusive doenças hepáticas gordurosas, hepatite B e C, resultam em lesões hepatocelulares constantes, convertendo-se em fibrose, e posterior, a cirrose hepática (MOKDAD; LOPEZ; SHAHRAZ; LOZANO *et al.*, 2014). Cerca de 50% das doenças hepáticas são causadoras de, aproximadamente, 2 milhões de mortes no mundo por ano (MOKDAD; LOPEZ; SHAHRAZ; LOZANO *et al.*, 2014). Pacientes com cirrose estão mais suscetíveis a serem infectados pelo SARS-CoV-2 e apresentarem um curso grave da doença, devido a sua imunodisfunção, possuindo piores desfechos clínicos, como hospitalização e maior risco de morte (MARJOT; MONN; OOK; ABD-ELSALAM *et al.*, 2021), demonstrando que, além de por si só ser uma doença extremamente nociva, a cirrose pode influenciar negativamente em outras patologias imunossupressoras.

Morfologicamente, a cirrose hepática é um estado fisiopatológico difuso no tecido, sendo fase final de muitas lesões no tecido (BARTNECK; WARZECHA; TACK, 2014), fundamenta-se no surgimento de nódulos regenerativos anormais de fibrose e alterações vasculares, em decorrência a danos crônicos, que repercutem em hipertensão portal (MAIA; BERTONCELLO; DA SILVA, PEREIRA *et al.*, 2022) e insuficiência hepática (MAEDA; SILVA; HARIMA; SILVA *et al.*, 2008). Outrossim, é segmentada em duas condições sintomatológicas; a fase compensada é assintomática, não apresentando maiores problemas

para o paciente e de difícil detecção, é na fase descompensada que se inicia a manifestação dos sintomas e a doença torna-se sistêmica (AYDIN; AKÇALI, 2018). Se não tratada previamente, há elevado risco de progressão para carcinoma hepatocelular, tornando o transplante de fígado única forma de terapia (MOKDAD; LOPEZ; SHAHRAZ; LOZANO *et al.*, 2014). A taxa de sobrevida dos indivíduos sujeitos ao transplante é de 60 a 80% nos cinco primeiros anos após o procedimento, a depender da doença hepática em questão (DE OLIVEIRA; DETTA; PAGLIONE; MUCCI *et al.*, 2019). As complicações vasculares não são incomuns após a cirurgia de transplante de fígado, tendo incidência em até 20% dos casos (DA FONSECA-NETO; MONTEIRO, 2021). A rejeição do enxerto pode ocorrer, repercutindo no mau funcionamento do órgão e consequentemente a necessidade de monitoramento e cuidados extras (MORRISSEY; FLYNN; LIN, 2007), o que amplia os custos para o sistema de saúde (PINSKY; TAKEMOTO; LENTINE; BURROUGHS *et al.*, 2009).

Para que os avanços tecnológicos e científicos da medicina sejam postos em prática, existe a necessidade do estudo prévio, desta forma, faz-se de extrema importância um modelo biológico de hepatocarcinogênese associada a cirrose, a fim de analisar os prejuízos ocasionados pela doença no processo de biodistribuição e captação de substâncias pelo fígado. Uma análise mais aprofundada da biodistribuição de NPMs no fígado, através da quantificação das mesmas, mediante a captação individual dos lobos é de grande relevância para avaliar a patologia. Estudos pré-clínicos possibilitam o aperfeiçoamento do atual conhecimento a respeito dessa doença e compreensão de como comporta-se a captação hepática e portanto auxilia no desenvolvimento de novos métodos com maior eficiência e acurácia. Atuais técnicas que envolvam analisar o processo de cirrose são, em sua maioria, invasivos, complexos ou fazem uso de radiação ionizante.

A biópsia hepática é considerada “*gold-standard*” aplicado na análise de necroinflamação e fibrose, é um método invasivo e preciso para avaliar o estágio da doença, normalmente em fases iniciais, a patologia só é detectada a partir da biópsia (SILVA; DA SILVA OLIVEIRA; FEITOSA; DE AZEVEDO SILVA *et al.*, 2020). Entretanto, a partir de novos avanços, novas alternativas não invasivas de diagnóstico do estágio de fibrose no tecido vem sendo desenvolvidas, biomarcadores séricos, como o ELF (*Enhanced Liver Fibrosis*), teste sérico fundamentado no conceito de que a fibrose é um processo dinâmico da elevação e da remodelação dos níveis séricos dos produtos da matriz extracelular (SILVA; DA SILVA OLIVEIRA; FEITOSA; DE AZEVEDO SILVA *et al.*, 2020) ; e ferramentas de imageamento como o IRM (*Imageamento por Ressonância Magnética*), a ultrassonografia hepática e a

tomografia computadorizada (CT) são procedimentos de imageamento desenvolvidos, não invasivos e empregados na detecção de fibrose (HUBER; EBNER; HEVERHAGEN; CHRISTE, 2015), contudo, essas técnicas demonstram desvantagens como a utilização de radiação ionizante, complexidade e custo elevado.

O sistema de Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica biomagnética de monitoramento e quantificação de materiais magnéticos, metodologia essa fortemente legitimada como competente na quantificação da biodistribuição de NPMs em tecidos biológicos (SOARES; PROSPERO; CALABRESI; RODRIGUES *et al.*, 2019). Comparada a outros métodos diretos destinados a detectar NPMs, como o já citado MRI e MPI, o sistema BAC apresenta diversas vantagens, a respeito de seu baixo custo, manuseamento simples e fácil, portabilidade, baixa invasividade, além de não utilizar de radiação ionizante e demonstrar eficiência na detecção de materiais magnéticos em baixas concentrações (CICOLIN, 2020).

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar e quantificar o processo de captação e biodistribuição das NPMs, fazendo-se uma avaliação individual de cada lobo hepático a fim de ampliar a precisão do estudo, em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese associada a cirrose, empregando como técnica de detecção o sistema BAC, o que garantirá informações fisiológicas extremamente relevantes e de maneira não invasiva.

2. OBJETIVOS

Analisar de que maneira o processo de hepatocarcinogênese modifica o perfil de captação, retenção e biodistribuição de NPMs por intermédio do sistema BAC, quando administradas intravenosamente em animais com funções saudáveis e em estágio de hepatocarcinogênese associado a cirrose. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Análise individual do perfil de biodistribuição de NPMs através da quantificação individual dos lobos hepáticos, possibilitando uma análise mais detalhada e precisa;
- Obtenção de imagens estáticas da biodistribuição.

3. METODOLOGIA

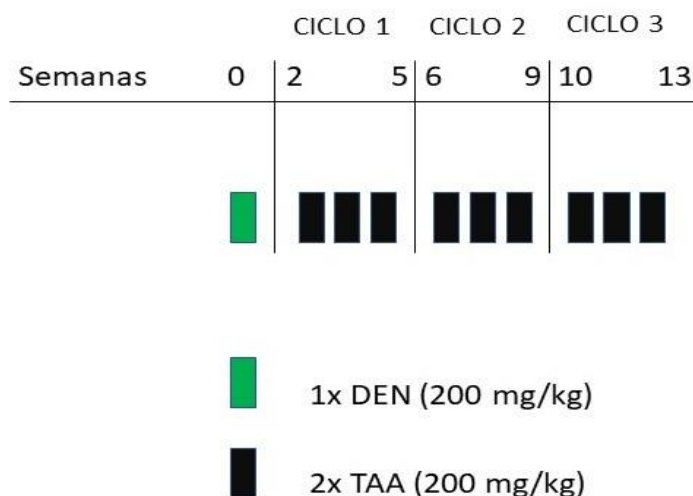
3.1. Modelo experimental

Neste trabalho, foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, pesando 250-350g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em condições adequadas a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12h/12h, filtração de ar constante e alimentação ad libitum. Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Uso e Cuidados com Animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (protocolo nº CEUA – IBB 5587230421). Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais, grupo controle e grupo tratado. Especificamente, os animais do grupo tratado foram submetidos a um protocolo de indução de hepatocarcinogênese associada a cirrose, de acordo com ROMUALDO *et. al* (ROMUALDO; GRASSI; GOTO; TABLAS *et al.*, 2017) e o grupo controle, denominado SAL, foi submetido a um procedimento de administração de soluções de salina à concentração 0,9% desprovida de veículo ativo.

3.2. Protocolo de indução

Com o objetivo de induzir a patologia no fígado dos animais, foi realizado um protocolo de indução. Na semana 0, os animais do grupo tratado, denominado DEN+TAA, foram submetidos a uma única dose, administrada por via intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg em solução salina 0,9%) em seguida, após 2 semanas dessa administração, iniciou-se durante mais onze semanas, três ciclos de injeções de tioacetamida (TAA, 200 mg/kg em solução salina 0,9%), duas vezes na semana, cada ciclo foi seguido de uma semana de intervalo sem o procedimento, como esquematizado na Figura 1. A fim de se assemelhar à patologia humana, o protocolo é a partir dessas duas drogas, 70 a 90% dos casos de carcinoma hepatocelular sugerem um fundo cirrótico, então é necessário a administração repetida de um agente fibrogênico, como a tioacetamida.

Figura 1 - Modelo de indução de cirrose. O esquema abaixo representa a divisão dos ciclos de injeções do grupo DEN+TAA em semanas.



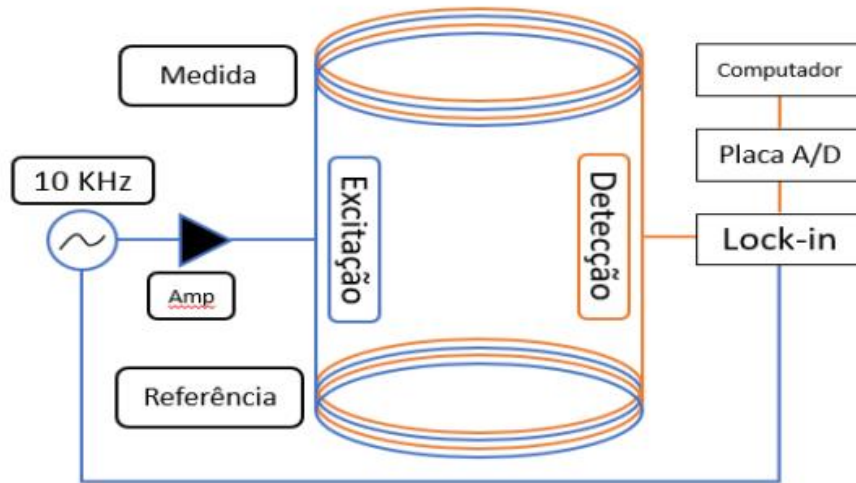
Fonte: Elaboração do próprio autor.

3.3. Biosusceptometria AC

O sistema BAC consiste em dois pares de bobinas, separados por uma distância de 15 cm. Cada par é composto por uma bobina de excitação (externa) e uma de detecção (interna), no qual as bobinas detectoras são conectadas coaxialmente em série e em sentidos opostos, com o intuito de reduzir o ruído ambiental, fornecendo boa relação sinal-ruído. O par de bobinas mais distante da amostra fornece o sinal de referência, enquanto o outro, mais próximo da amostra, atua como detector.

Um amplificador *lock-in* (SR830, Stanford Research Systems, Sunnyvale, EUA) gera um sinal de 0,7 V a 10 kHz, que é amplificado para 40 V através de um amplificador de potência (TIP 800, Ciclotron, Barra Bonita, Brasil) e aplicado nas bobinas excitadoras, gerando um campo magnético que atravessa a seção transversal das bobinas de detecção. A presença de materiais magnéticos próximos a bobina de detecção desequilibra o fluxo magnético total do sistema. O sinal elétrico gerado nas bobinas de detecção pela presença do material magnético retorna ao amplificador *lock-in*, que processa o sinal de saída para adquirir a componente de 10 kHz e convertê-lo em um sinal DC. O sinal é adquirido em tempo real (LabVIEW 2010, National Instruments, Austin, EUA), digitalizado por uma placa A/D (DAQPad-6015, National Instruments, Austin, EUA) e armazenado em um computador. O diagrama funcional do sistema BAC é representado na Figura 2.

Figura 2 – Representação do diagrama funcional do sistema BAC.

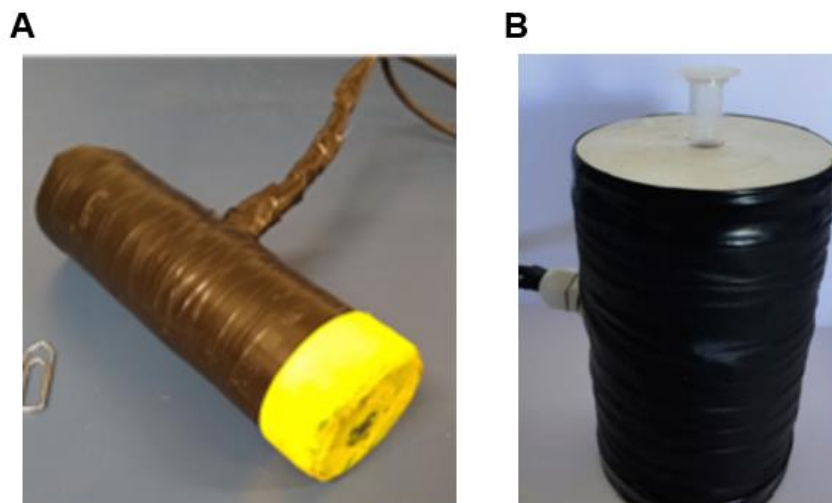


Fonte: CICOLIN (2020).

A intensidade do sinal captado no sistema é proporcional à quantidade de material magnético e inversamente proporcional à distância entre o sensor e o material. Tais características intrínsecas do sistema viabilizam avaliar e quantificar a biodistribuição de NPMs, assim como obter imagens magnéticas do acúmulo de NPMs.

Neste estudo foram empregados dois arranjos de sensores BAC, o primeiro, sensor BAC monocal canal foi desenvolvido para aplicações em medidas magnéticas *in vivo* e permite a obtenção de imagens magnéticas através do escaneamento auxiliado de uma mesa CNC automática. Já o sensor BAC cavidade foi projetado para quantificação de amostras *ex vivo*, neste, a amostra é posicionada no centro das bobinas de detecção, aumentando a sensibilidade do sensor em até uma ordem de magnitude, quando comparado com o sensor BAC monocal canal (PRÓSPERO; SOARES; MORETTO; QUINI *et al.*, 2020). Na Figura 3 é possível visualizar o sensor monocal canal (3-A) e o sensor BAC cavidade (3-B).

Figura 3 – Arranjos de sensores BAC utilizados. (A) - Sensor monocanal. (B) – Sensor BAC cavidade.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

3.4. Nanopartículas magnéticas

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) revestidas com citrato, utilizadas devido a sua excelente resposta ao campo magnético do sistema BAC. Essas nanopartículas possuem diâmetro do núcleo $14 + 5$ nm e tamanho hidrodinâmico. Estudos já consolidados do sistema BAC, fazendo uso desse tipo de NPMs, como o de SOARES *et. al* (SOARES; PROSPERO; CALABRESI; RODRIGUES *et al.*, 2019), que consistiu em mapear a biodistribuição e avaliar o perfil farmacocinético de NPMs por imagem em modelos biológicos, e o de CALABRESI que avaliou a contração e esvaziamento gástrico em ratos gastretomizados (CALABRESI, 2013), afirmam a eficiência do emprego dessas NPMs para análises via sistema BAC. As nanopartículas foram fornecidas, sintetizadas e caracterizadas pelo laboratório de Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo do Departamento de Física da Universidade Federal de Goiânia, sob coordenação do Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis.

3.5. Protocolo de experimentação animal para as análises via BAC

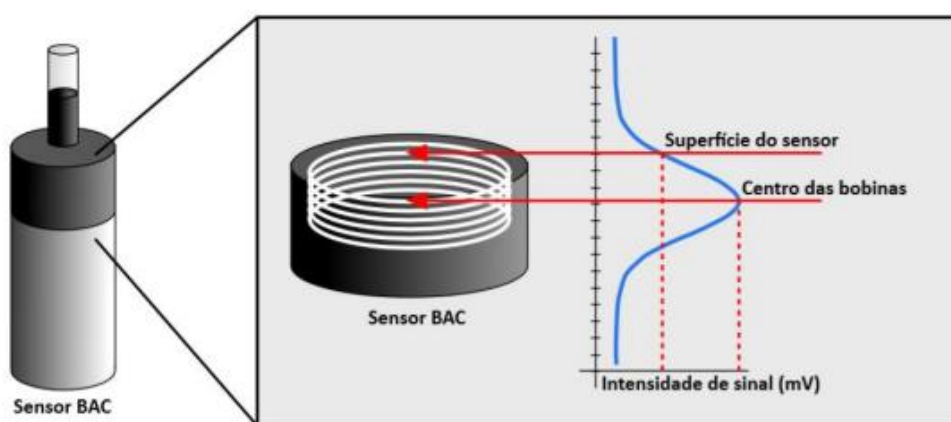
Posterior ao ciclo de indução das lesões hepáticas no grupo DEN+TAA, em ambos agrupamentos foram administradas as NPMs, via canulação da veia femoral, (32 mg/kg, sob anestesia (99% uretano – 1,4 mg/kg). Uma hora após a cirurgia de canulação e administração das NPMs na corrente sanguínea, os animais foram eutanasiados por método de decapitação

dos vasos cervicais. Os órgãos de interesse, como fígado, baço, coração, pulmão, rins e uma amostra de sangue foram coletados para realização de análise de. Em particular, os fígados dos animais foram retirados e posicionados em um suporte de acrílico da mesa de varredura para o escaneamento e reconstrução das imagens estáticas *in vivo* da biodistribuição hepática.

3.5.1. Análises via BAC

Neste trabalho, o sistema BAC foi utilizado para dois propósitos: análise da biodistribuição e escaneamento do fígado, principal órgão de interesse avaliado. Para a realização das análises da biodistribuição, decorrido a administração das NPMs, eutanásia dos animais e coleta dos órgãos, as amostras foram submetidas a um processo de liofilização para a remoção de água presente no tecido. Posteriormente, foram homogeneizadas e armazenadas em tubos de volume controlado. Após esse processo, as amostras foram posicionadas no centro de detecção do sensor BAC cavidade e registrou-se o valor de intensidade de sinal. O sensor BAC cavidade, apresentado na Figura 4, foi projetado possuindo um orifício, propositalmente localizado em seu centro geométrico, com intuito de proporcionar significativo ganho de sensibilidade, essencial a fim de determinar massa de NPMs presentes no tecido, essa conformação permite que amostras sejam dispostas nesta cavidade central, ampliando o ganho de sinal captado do material magnético presente na amostra analisada e, portanto, ampliando a precisão da medida.

Figura 4 - Representação do sensor BAC cavidade, ilustrando o ganho de sensibilidade concedido pela conformação.

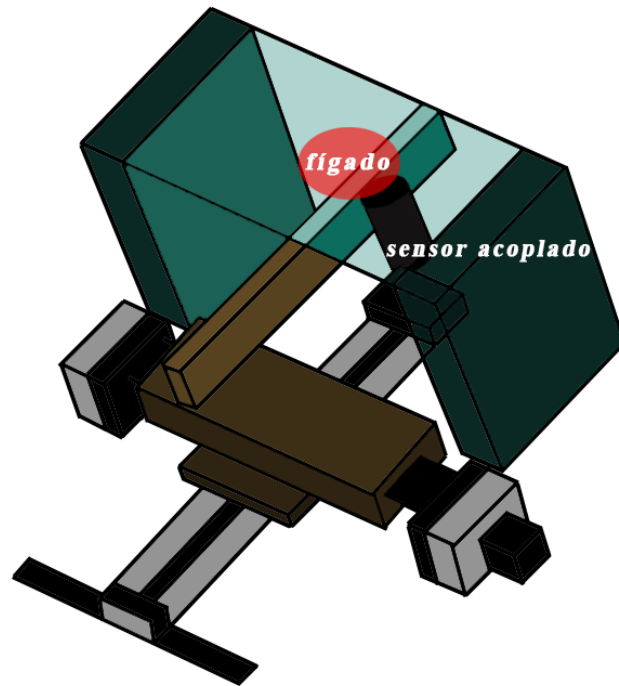


Fonte: CICOLIN (2020).

Antecedente a realização do protocolo de biodistribuição do fígado, foi realizado o

escaneamento deste órgão. No processo do escaneamento, foi empregado o sensor BAC monocanal o qual foi acoplado a uma mesa CNC, a fim de quantificar a biodistribuição de NPMs individual e especificamente no fígado de ambos os grupos experimentais por imageamento. O órgão foi posicionado em um suporte de acrílico e o sensor abaixo deste suporte acoplado à mesa, como está representado na Figura 5. Através da aquisição de intensidade de sinal, se torna possível gerar imagens diante da varredura automatizada do tecido, com consequente acréscimo na resolução espacial do sistema, tratando-se de uma aquisição direta no órgão, parâmetro crucial a fim de relacionar as dimensões originais do tecido estudado com a intensidade de sinal captado.

Figura 5 - Representação da mesa de varredura utilizada para o escaneamento do tecido.

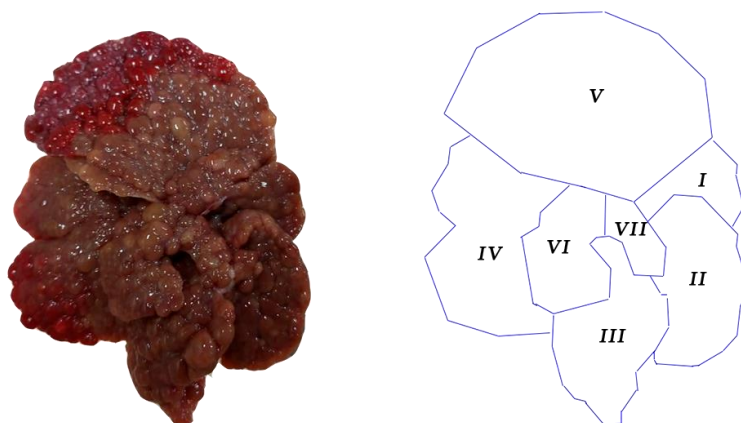


Fonte: Elaboração do próprio autor.

Decorrido o escaneamento, o fígado de todos os animais foram subdivididos em sete lobos e coletados, para posterior quantificação dos lobos. A anatomia do fígado de ratos não se altera, entretanto, em muitos estudos ela aparece com nomenclaturas diferente, mais comumente é dividida em quatro lobos: lobo mediano de maior tamanho, lobo lateral direito, lobo lateral esquerdo e um pequeno lobo caudado. De acordo com POPESKO *et. Al*, o fígado é dividido em seis lobos: medial esquerdo, lateral, medial direito, lobo lateral, lobo caudado e lobo quadrado (POPESKO; RAJTOVÁ; HORAK, 1992). Já LORENTE *et. al* diz que o fígado

é dividido em duas partes: superior e inferior e subdividido seis setores (LORENTE; ALLER; RODRIGUEZ; DURAN *et al.*). Neste estudo, optou-se por separá-lo em sete devido a aparência anatômica dos órgãos dos roedores utilizados para o estudo, como ilustrado na Figura 6, desta maneira, foi determinada uma divisão lógica para coleta individual de cada parte do fígado e portanto aumentar a precisão das análises.

Figura 6 - Representação da divisão anatômica dos lobos hepáticos para análise individual da biodistribuição em tecido hepático afetado por cirrose.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Com intuito de comparar os grupos experimentais foi utilizado um teste t Student não pareado. Foi considerado para o teste t de Student um nível de significância de $p < 0,005$. As análises foram realizadas a partir do software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

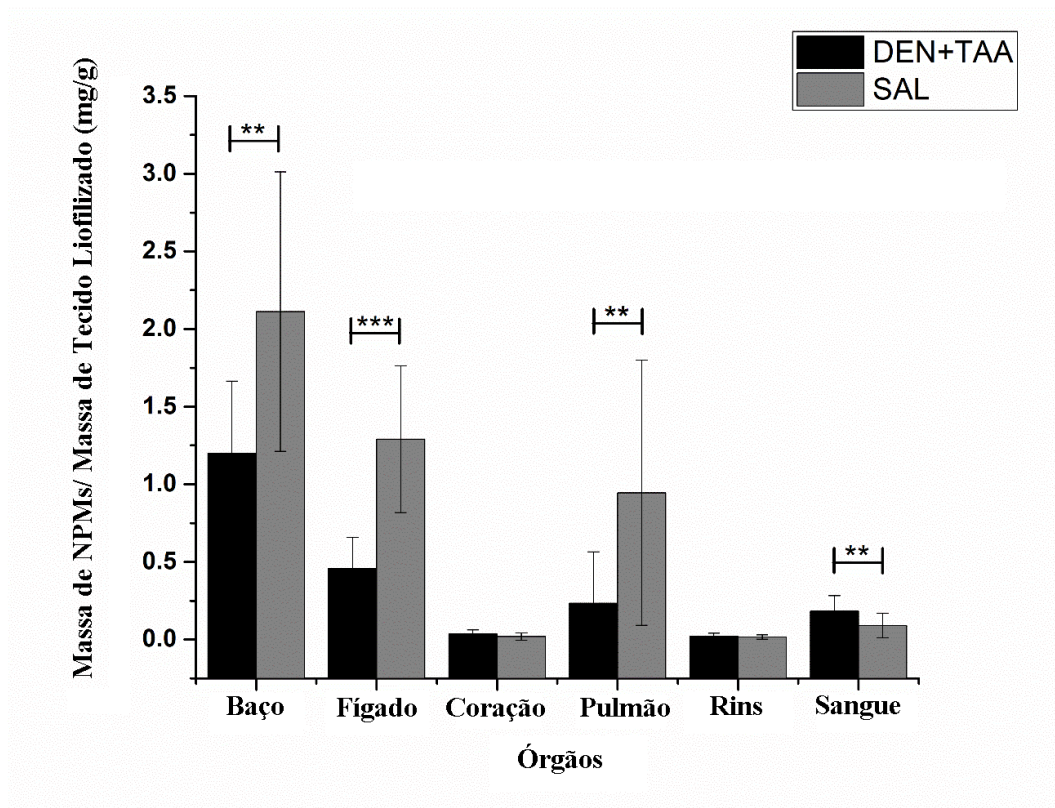
4.1. Quantificação de nanopartículas magnéticas via sensor cavidade

4.1.1. Quantificação da biodistribuição de NPMs em órgãos de interesse

A quantificação da biodistribuição em órgãos de interesse e sangue coletados, de ambos os grupos experimentais, comparou a captação de NPMs entre esses órgãos, demonstrado na Figura 7. Verificou-se a quantificação das massas de NPMs por miligrama de órgãos secos a

partir do sensor BAC cavidade, de maneira *ex vivo*.

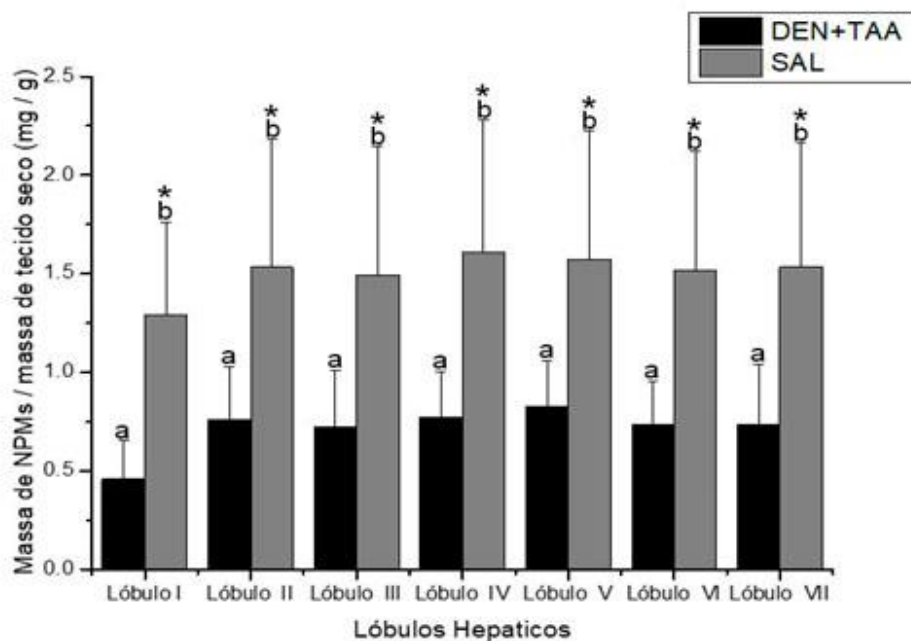
Figura 7 - Representação dos dados da biodistribuição de nanopartículas magnéticas em ambos os grupos experimentais.



4.1.2. Quantificação individual da biodistribuição de NPMs em lobos hepáticos

A quantificação da biodistribuição de NPMs relacionada a cada lobo hepático, de ambos os grupos experimentais, averiguou e comparou de que maneira o acúmulo de NPMs ocorre em cada lobo, apresentado na Figura 8. Verificou-se a quantificação das massas de NPMs por miligrama de tecido hepático seco a partir do sensor BAC cavidade, de maneira *ex vivo*.

Figura 8 - Representação dos dados da biodistribuição individual dos lobos hepáticos das nanopartículas magnéticas em ambos os grupos experimentais.

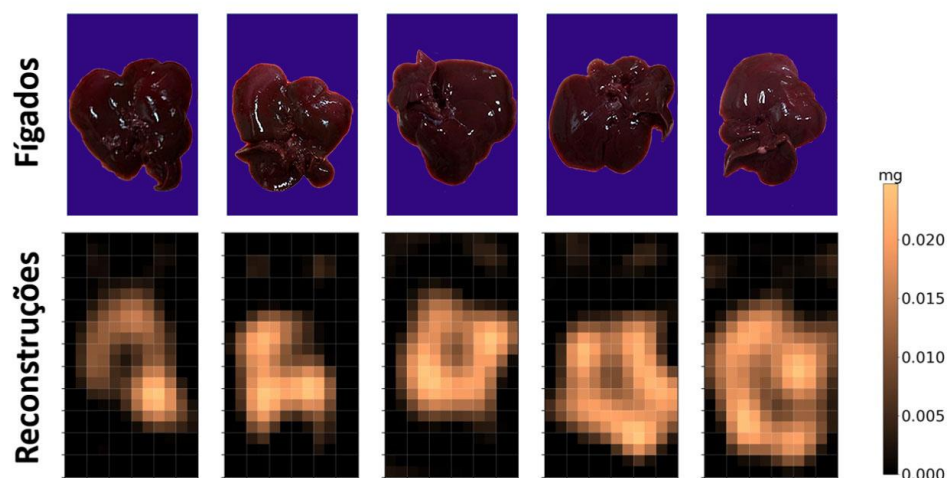


4.2. Imageamento dos fígados via sensor BAC monocanal

4.2.1. Imagens estáticas dos fígados saudáveis

A reconstrução de imagens estáticas representativas da biodistribuição, a partir do escaneamento do fígado dos animais do grupo SAL, permitiu analisar visualmente de que maneira as NPMs se acumulam em tecido hepático sem prejuízo de funcionalidade, apresentado na Figura 9.

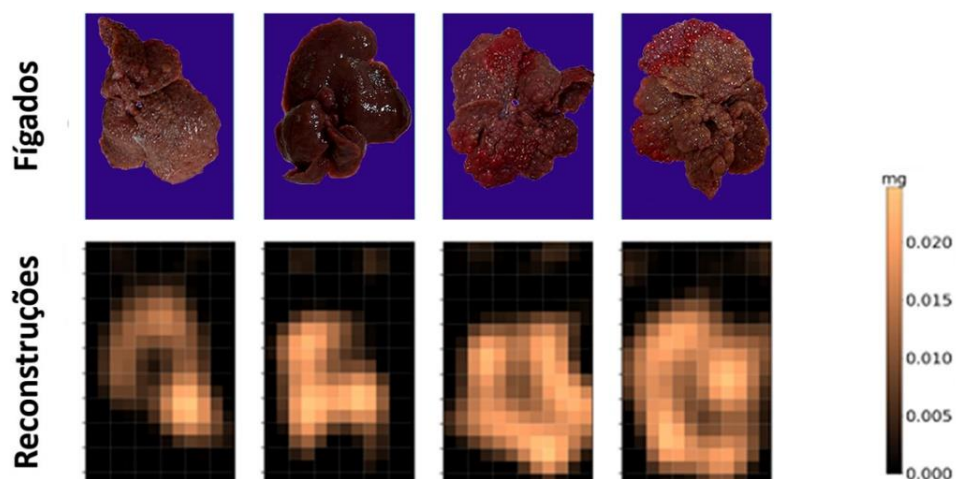
Figura 9 - Imagens representativas do acúmulo de NPMs em fígados dos animais do grupo SAL.



4.2.2. Imagens estáticas dos fígados lesionados

A reconstrução de imagens estáticas representativas da biodistribuição, a partir do escaneamento do fígado dos animais cirróticos do grupo DEN+TAA, permitiu avaliar de que maneira o acúmulo de NPMs ocorre no tecido hepático prejudicado, como ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Imagens representativas do acúmulo de NPMs em fígados dos animais cirróticos do grupo DEN+TAA.



5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi executada uma análise a respeito do perfil da biodistribuição de NPMs em tecido hepático, a partir da indução de um modelo de hepatocarcinogênese associada a cirrose em ratos, utilizando o sistema BAC como método de avaliação. O sistema, além de apresentar vantagens como portabilidade, baixo custo e invasividade, pode ser empregado a partir de duas conformações, a primeira, o sensor BAC cavidade, a fim de quantificar a massa de NPMs por miligrama de órgão seco, a segunda, o BAC monocanal, escaneando diretamente o tecido desejado. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de aclarar nossa compreensão sobre os prejuízos ocasionados pela cirrose, para desenvolver fármacos mais eficientes e seguros para apaziguar e auxiliar o tratamento dessa patologia tão complexa e silenciosa.

Em contexto geral, foi possível comprovar certa semelhança entre o perfil de biodistribuição entre os grupos experimentais, analisados separadamente, uma vez que, baço e fígado demonstraram aprisionar maior parte das NPMs introduzidas na circulação sistêmica, via cirurgia de canulação, em relação aos outros órgãos examinados. Essa elevada captação esplênica é consequência da presença de macrófagos no tecido (ALPHANDÉRY, 2019). Contudo, o estudo também demonstra relevantes disparidades, quando comparado o grupo SAL e DEN+TAA, em relação ao grupo com presença da doença, os animais saudáveis apresentaram maior acúmulo de NPMs. A quantificação por intermédio do sensor BAC cavidade revelou que o acúmulo de NPMs de órgãos como rins e coração foram mínimos, em contraposição com outros tecidos, ilustrando desprezíveis valores de deposição de nanopartículas, já que ambos não possuem células especializadas na captura e retenção de xenobióticos, explicando o sinal reduzido desses tecidos, ilustrado na Figura 8. Ademais, ambos não demonstram significativa desigualdade entre os grupos experimentais, insinuando que além das NPMs possuírem propriedades de amplificar e facilitar a captação hepática e esplênica, os prejuízos ocasionados pela lesão hepática induzida não são capazes de influenciar a deposição de NPMs nesses órgãos.

Não somente análise da biodistribuição entre órgãos de interesse, foi realizada uma investigação individual a respeito da captação hepática, mediante a quantificação individual dos lobos hepáticos. Estudando com mais particularidade o acúmulo de NPM, foi possível atentar-se à homogeneidade em que a patologia degrada sua funcionalidade, visto isso, foi entendido que o perfil de retenção em estágios lesionados é alterado em virtude das inúmeras alterações microvasculares acarretadas pelas lesões em estágio cirrótico. Neste estágio, as células do parênquima são destruídas e substituídas por tecido fibroso, que por sua vez, concentra-se na vizinhança dos vasos sanguíneos, prejudicando o fluxo de sangue portal (HALL, 2021). O

fígado cirrótico apresenta capilarização de seus sinusóides, desde alterações no endotélio, depósito na membrana basal, até desaparecimento de sua vasculatura fenestrada, mudança na interação célula-matriz e célula-célula (PAUL; SHARMA, 2014), até o surgimento de novos vasos arteriais, denominados fístulas hepáticas, que consistem no aparecimento de ligações anômalas no parênquima (FONSECA, 2011), que por consequência incitam resistência ao fluxo sanguíneo e alteram o fluxo sanguíneo. Doenças hepáticas uniformemente apresentam aparecimento espontâneo de fístulas intra-hepáticas, principalmente em fígados cirróticos, as denominadas fístulas arteriovenosas portais transtumorais tendem a acentuar a hipertensão portal subjacente (WIDMAN; SPERANZINI; OLIVEIRA; SAAD, *et al.*, 2000). A capilarização transforma os sinusóides, antes altamente permeável à macromoléculas, em capilares comuns, impróprio para passagem de metabólitos, se tornando uma grande barreira para o funcionamento habitual do órgão (FONSECA, 2011). Esse conjunto de transformações alteram o trânsito da corrente sanguínea, reduzindo o fluxo sanguíneo, e consequentemente a quantidade de NPMs que penetra no órgão, dificultando seu contato com CKs residentes do tecido hepático (SOARES; PROSPERO; CALABRESI; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Avaliando a reconstrução da biodistribuição de NPMs por imagens, confirma-se o êxito da possibilidade de geração de imagens estáticas aplicando o sensor BAC monocanal, ao relacionar condizentemente o tamanho real do órgão com o sinal captado. Foi verificado o aumento da extensão dos fígados do grupo experimental dos animais lesionados, devido ao excesso de acúmulo de matriz extracelular pelo processo de fibrose, o tecido pode alcançar até duas vezes de seu tamanho habitual. Em virtude do volume amplificado, os fígados dos animais cirróticos demonstraram significativa captação de NPMs, mesmo com sua funcionalidade severamente prejudicada. Acredita-se que o excesso de NPMs verificada a partir da reconstrução das imagens estáticas dos fígados cirróticos não esteja assimilada ao tecido pelas CKs, mas sim dispersas pela extensão do órgão.

Nós do Laboratório de Biomagnetismo da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) reconhecemos certas limitações intrínsecas da BAC, como a incapacidade de utilizar concentrações reduzidas de NPMs, ocasionado pela carência de sensibilidade, incapaz de ser fornecida atualmente. Visto isso, o OPM (*Optical Pumped Magnetometers*), recente dispositivo desenvolvido capaz de medir campos magnéticos, demonstrando alta sensibilidade, além de detectar NPMs eficientemente (KNAPPE, S.; SANDER, T. H.; KOSCH, O.; WIEKHORST, F. *et al.*, 2010), será futuramente, combinado ao sistema BAC, a fim de suprir a necessidade do sistema de maior sensibilidade.

6. CONCLUSÃO

O escaneamento via BAC monocanal apresentou eficiência no procedimento a fim de aclarar como a biodistribuição de NPMs em tecido hepático decorre, correlacionando, com significativa qualidade, as dimensões reais do órgão investigado com a intensidade do sinal adquirido, desenvolvendo assim um protocolo eficiente de imageamento.

Outrossim, com a avaliação individual do lobo hepático, entendeu-se que o órgão é prejudicado como um todo com o avanço do processo de fibrose, degradando o potencial de acúmulo de NPMs. Foi averiguado pelo sensor BAC cavidade que, animais com suas funções fisiológicas hepáticas não lesionadas demonstram maior retenção de NPMs em relação aos lesionados pelo estado de cirrose, e essa retenção acontece de maneira uniforme em ambas situações examinadas.

A avaliação da evolução do estágio de fibrose até o desenvolvimento da cirrose, com a utilização de NPMs, em parceria com o sistema BAC, colabora com o entendimento da manifestação dessas lesões, e contribui com a compreensão de sua influência no acúmulo de possíveis fármacos.

7. REFERÊNCIAS

- ALPHANDÉRY, E. J. N. Biodistribution and targeting properties of iron oxide nanoparticles for treatments of cancer and iron anemia disease. **Nanotoxicology**, v. 13, n. 5, p. 573-596, 2019.
- ANDRADE, Z. A. J. R. d. S. B. d. M. T. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 514-520, 2005.
- ARAMI, H.; KHANDHAR, A. P.; TOMITAKA, A.; YU, E. *et al.* In vivo multimodal magnetic particle imaging (MPI) with tailored magneto/optical contrast agents. **Biomaterials**, v. 52, p. 251-261, 2015.
- ARMS, L.; SMITH, D. W.; FLYNN, J.; PALMER, W. *et al.* Advantages and limitations of current techniques for analyzing the biodistribution of nanoparticles. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 802, 2018.
- ASLAM, H.; SHUKRULLAH, S.; NAZ, M. Y.; FATIMA, H. *et al.* Current and future perspectives of multifunctional magnetic nanoparticles based controlled drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102946, 2021.
- ASSA, F.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; AJAMEIN, H.; ANARJAN, N. *et al.* A biotechnological perspective on the application of iron oxide nanoparticles. **Nano Research**, v. 9, n. 8, p. 2203-2225, 2016.
- AYDİN, M. M.; AKÇALI, K. C. J. T. T. J. o. G. Liver fibrosis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 14, 2018.

BARTNECK, M.; WARZECHA, K. T.; TACKE, F. J. H. s.; NUTRITION. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 3, n. 6, p. 364, 2014.

BEDANTA, S.; KLEEMANN, W. J. J. o. P. D. A. P. Supermagnetism. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 1, p. 013001, 2008.

BRANQUINHO, L. C.; CARRIÃO, M. S.; COSTA, A. S.; ZUFELATO, N. *et al.* Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2013.

CALABRESI, M. F. d. F. Avaliação da atividade de contração e evaziamento gástrico em ratos gastrotomizados por biosusceptometria AC. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho Botucatu. Instituto de Biociências, Botucatu 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/87759>. Acessado em 15/02/2023.

CARDOSO, V. F.; FRANCESKO, A.; RIBEIRO, C.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M. *et al.* Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 5, p. 1700845, 2018.

CICOLIN, R. Avaliação do tempo de circulação e biodistribuição de nanopartículas magnéticas com diferentes tipos de revestimento utilizando a técnica de biosusceptometria ac. 2020. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho Botucatu. Instituto de Biociências, Botucatu 2020. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/192214>. Acessado em 15/02/2023.

COLE, A. J.; DAVID, A. E.; WANG, J.; GALBÁN, C. J. *et al.* Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6291-6301, 2011.

CORDERO-ESPINOZA, L.; HUCH, M. J. T. J. o. c. i. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 1, p. 85-96, 2018.

DA FONSECA-NETO, O. C. L.; MONTEIRO, B. R. J. B. J. o. T. ARTÉRIA HEPÁTICA: EMBRIOLOGIA, ANATOMIA E IMPLICAÇÕES NO TRANSPLANTE HEPÁTICO. **Brazilian Journal of Transplantation**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2021.

DE FARIA, C.; DE OLIVEIRA, A.; ORTIZ, W. J. R. B. d. E. d. F. s. Estudo de Materiais Pela Técnica de Suscetibilidade Magnética AC. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.

DE OLIVEIRA, P. C.; DETTA, F. P.; PAGLIONE, H. B.; MUCCI, S. *et al.* Adesão ao tratamento no transplante de fígado: revisão integrativa. **Cogitare Enfermagem**, v. 24, 2019.

EZHILARASAN, D. J. E. J. o. P. Advantages and challenges in nanomedicines for chronic liver diseases: A hepatologist's perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v. 893, p. 173832, 2021.

FADEEL, B.; ALEXIOU, C. J. B.; COMMUNICATIONS, B. R. Brave new world revisited: Focus on nanomedicine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 1, p. 36-49, 2020.

FARIA, J. V. C. Estudo da biodistribuição e determinação da eliminação de nanopartículas magnéticas em tempos longos por biosusceptometria de corrente alternada. 2020. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho Botucatu. Instituto de Biociências, Botucatu 2020. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/192214>. Acessado em 15/02/2023.

FONSECA, Y. d. O. Cirrose hepática e sua regressão: enfoque na capilarização sinusoidal. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011. Acessado em 15/02/2023. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4149>. Acessado dia 15/02/2023.

- FONTES, J. P. Nanociência, nanotecnologia e o ensino de graduação em medicina no Brasil: cenário atual. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/27063>. Acessado 15/02/2023.
- FRANTELLIZZI, V.; CONTE, M.; PONTICO, M.; PANI, A. *et al.* New frontiers in molecular imaging with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): efficacy, toxicity, and future applications. **Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 54, n. 2, p. 65-80, 2020.
- GONÇALVES, M.; RAMALHO, C. J. R. V. d. Q. Agentes de contraste para imagem por Ressonância Magnética: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1511-1524, 2017.
- HALL, J. E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica.** Elsevier Health Sciences, 2021. 8413820731.
- HUBER, A.; EBNER, L.; HEVERHAGEN, J. T.; CHRISTE, A. J. E. j. o. r. o. State-of-the-art imaging of liver fibrosis and cirrhosis: A comprehensive review of current applications and future perspectives. **European journal of radiology open**, v. 2, p. 90-100, 2015.
- KIM, B. Y.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. J. N. E. J. o. M. Nanomedicine. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434-2443, 2010.
- KNAPPE, S.; SANDER, T. H.; KOSCH, O.; WIEKHORST, F. *et al.* Cross-validation of microfabricated atomic magnetometers with superconducting quantum interference devices for biomagnetic applications. **Applied Physics Letters**, v. 97, n. 13, p. 133703, 2010.
- KUMAR, R.; ROY, I.; OHULCHANSKKY, T. Y.; VATHY, L. A. *et al.* In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. **ASC nano**, v. 4, n. 2, p. 699-708, 2010.
- LEGGE, C. J.; COLLEY, H. E.; LAWSON, M. A.; RAWLINGS, A. E. J. J. o. O. P. *et al.* Targeted magnetic nanoparticle hyperthermia for the treatment of oral cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 9, p. 803-809, 2019.
- LOEWA, N.; WIEKHORST, F.; GEMEINHARDT, I.; EBERT, M. *et al.* Cellular uptake of magnetic nanoparticles quantified by magnetic particle spectroscopy. **IEEE transactions on magnetics**, v. 49, n. 1, p. 275-278, 2012.
- LORENTE, L.; ALLER, M.; RODRIGUEZ, G.; DURAN, M. *et al.* Surgical anatomy of the liver in Wistar rats. **Surgical Research Communications**, v. 17, n. 2, p. 113-122, 1995.
- MAEDA, M. d. F. Y.; SILVA, C. D.; HARIMA, L. S.; SILVA, L. F. F. d. *et al.* Vascularização na cirrose hepática: estudo imunoistoquímico baseado em necropsias. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, p. 38-45, 2008.
- MAIA, J. C.; BERTONCELLO, K. C. G.; DA SILVA, A. M.; PEREIRA, A. P. G. T. *et al.* Diagnósticos de enfermagem em pacientes com cirrose hepática em um serviço hospitalar de emergência. **HU REVISTA**, v. 48, p. 1-8, 2022.
- MARJOT, T.; MOON, A. M.; COOK, J. A.; ABD-ELSALAM, S. *et al.* Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: an international registry study. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 3, p. 567-577, 2021.
- MAUREA, S.; MAINENTI, P. P.; TAMBASCO, A.; IMBRIACO, M. *et al.* Diagnostic accuracy of MR imaging to identify and characterize focal liver lesions: comparison between gadolinium and superparamagnetic iron oxide contrast media. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 4, n. 3, p. 181, 2014.

- MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 2, p. 101-124, 2021.
- MOKDAD, A. A.; LOPEZ, A. D.; SHAHRAZ, S.; LOZANO, R. *et al.* Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2014.
- MORRISSEY, P. E.; FLYNN, M. L.; LIN, S. J. D. Medication noncompliance and its implications in transplant recipients. **Drugs**, v. 67, n. 10, p. 1463-1481, 2007.
- OLIVEIRA, A. M. B.; DE SOUZA LIMA, B. S. J. R. S. e. M. A. NANOMEDICINA: APLICACÕES NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 84-101, 2021.
- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. J. N. N., Biology; MEDICINE. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.
- PAUL, S. B.; SHARMA, H. J. J. o. C.; HEPATOLOGY, E. Role of transcatheter intra-arterial therapies for hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 4, p. S112-S121, 2014.
- PINSKY, B.; TAKEMOTO, S.; LENTINE, K.; BURROUGHS, T. *et al.* Transplant outcomes and economic costs associated with patient noncompliance to immunosuppression. **American journal of transplantation**, v. 9, n. 11, p. 2597-2606, 2009.
- POPESKO, P.; RAJTOVÁ, V.; HORAK, J. **Colour atlas of the anatomy of small laboratory animals**. Wolfe Pub. Ltd, 1992. 0723418233.
- PRÓSPERO, A. G.; SOARES, G. A.; MORETTO, G. M.; QUINI, C. C. *et al.* Dynamic cerebral perfusion parameters and magnetic nanoparticle accumulation assessed by AC biosusceptometry. **Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik**, v. 65, n. 3, p. 343-351, 2020.
- ROMUALDO, G. R.; GRASSI, T. F.; GOTO, R. L.; TABLAS, M. B. *et al.* An integrative analysis of chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis: Histological, biochemical and molecular features. **Toxicology Letters**, v. 281, p. 84-94, 2017.
- SAMROT, A. V.; SAHITHYA, C. S.; SELVARANI, J.; PURAYIL, S. K. *et al.* A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, p. 100042, 2021.
- SILVA, T. S. A. S.; DA SILVA OLIVEIRA, P.; FEITOSA, R. V.; DE AZEVEDO SILVA, R. *et al.* Métodos de detecção de fibrose em pacientes cirróticos: revisão sistemática. **Pará Research Medical Journal**, v. 4, p. 0-0, 2020.
- SOARES, G. A.; PROSPERO, A. G.; CALABRESI, M. F.; RODRIGUES, D. S. *et al.* Multichannel AC Biosusceptometry system to map biodistribution and assess the pharmacokinetic profile of magnetic nanoparticles by imaging. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 18, n. 3, p. 456-462, 2019.
- SUN, T.; KANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y. *et al.* Nanomaterials and hepatic disease: toxicokinetics, disease types, intrinsic mechanisms, liver susceptibility, and influencing factors. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-23, 2021.
- TACKE, F.; WEISKIRCHEN, R. J. E. r. o. g.; HEPATOLOGY. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. **Expert Review of gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2012.
- VASCONCELOS, C. V.; DA SILVA OLIVEIRA, G. d. S.; BARBOSA, N. A.; SUWA, U. F. J. B. J. o. D. Advances in the diagnosis and therapy of liver cirrhosis: a systematic review Avanços no diagnóstico

e terapia da cirrose hepática: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 120828-120845, 2021.

WAGNER, S.; SCHNORR, J.; PILGRIMM, H.; HAMM, B. *et al.* Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. **Investigative radiology**, v. 37, n. 4, p. 167-177, 2002.

WIDMAN, A.; SPERANZINI, M. B.; OLIVEIRA, I. R.; SAAD, W. A. *et al.* Fístulas arteriovenosas intra-hepáticas transtumorais (diagnóstico, importância e propostas de tratamento). **Arquivos de Gastroenterologia**, v.37, p. 13-19, 2000.

ZEINALI SEHRIG, F.; MAJIDI, S.; NIKZAMIR, N.; NIKZAMIR, N. *et al.* Magnetic nanoparticles as potential candidates for biomedical and biological applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 918-927, 2016.

ZHANG, Y.-N.; POON, W.; TAVARES, A. J.; MCGILVRAY, I. D. *et al.* Nanoparticle–liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination. **Journal of controlled release**, v. 240, p. 332-348, 2016.