

**Como citar este artigo:**

Rego GN, Mamani JB, Souza TK, Nucci MP, Silva HR, Gamarra LF. Avaliação terapêutica da técnica de magneto-hipertermia utilizando nanopartículas de  $Fe_3O_4$  recobertas com aminosilana no modelo animal de glioblastoma. *einstein* (São Paulo). 2019;17(4):eAO4786. [http://dx.doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019AO4786](http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4786)

**Autor correspondente:**

Lionel Fernel Gamarra  
Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi  
CEP: 05652-900 – São Paulo, SP, Brasil  
Tel.: (11) 3747-0243  
E-mail: lionelgamarra7@gmail.com

**Data de submissão:**

4/10/2018

**Data de aceite:**

28/3/2019

**Conflitos de interesse:**

não há.

**Copyright 2019**

Esta obra está licenciada sob  
uma Licença *Creative Commons*  
Atribuição 4.0 Internacional.

## ARTIGO ORIGINAL

# Avaliação terapêutica da técnica de magneto-hipertermia utilizando nanopartículas de $Fe_3O_4$ recobertas com aminosilana em modelo animal de glioblastoma

Therapeutic evaluation of magnetic hyperthermia using  $Fe_3O_4$ -aminosilane-coated iron oxide nanoparticles in glioblastoma animal model

Gabriel Nery de Albuquerque Rego<sup>1</sup>, Javier Bustamante Mamani<sup>1</sup>, Taylla Klei Felix Souza<sup>1</sup>, Mariana Penteadu Nucci<sup>2</sup>, Helio Rodrigues da Silva<sup>1</sup>, Lionel Fernel Gamarra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein\_journal/2019AO4786

**RESUMO**

**Objetivo:** Avaliar o potencial da técnica de magneto-hipertermia utilizando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana em modelo de tumores de glioblastoma. **Métodos:** As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana foram avaliadas quanto à sua estabilidade em meio aquoso e a seu potencial de aquecimento pela taxa de absorção específica, quando submetidas à magneto-hipertermia, com diferentes frequências e intensidades de campo magnético alternado. Nos ensaios de magneto-hipertermia *in vitro*, as células C6 cultivadas e transduzidas com luciferase foram avaliadas por bioluminescência na presença/ausência do campo magnético alternado, como também com e sem nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana. No estudo *in vivo*, a medida de bioluminescência foi adquirida no 21º dia após indução do glioblastoma com células C6 nos ratos. Após 24 horas, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana foram implantadas no animal, tendo sido realizada a magneto-hipertermia por 40 minutos, nas melhores condições de frequência e intensidade de campo magnético alternado testado no estudo *in vitro* (maior valor da taxa de absorção específica); foi verificada a diferença do bioluminescência antes e após a magneto-hipertermia. **Resultados:** As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana se mostraram estáveis, e sua capacidade de aquecimento aumentou com o incremento da frequência e da intensidade de campo magnético alternado. A aplicação da magneto-hipertermia, com 874kHz e 200 Gauss do campo magnético alternado, determinou o melhor valor da taxa de absorção específica (194,917W/g). Quando utilizados, estes parâmetros de magneto-hipertermia *in vitro* resultaram em morte celular de 52,0% e *in vivo* de 32,8% por bioluminescência. **Conclusão:** A técnica de magneto-hipertermia foi promissora para o processo terapêutico de tumores de glioblastoma no modelo animal utilizando as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana recobertas com aminosilana, que apresentaram alta taxa de absorção específica.

**Descritores:** Glioblastoma/terapia; Magneto, hipertermia; Nanopartículas; Nanopartículas de magnetita; Aminosilana; Modelo tumoral; Ratos

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the potential of magnetic hyperthermia using aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioblastoma tumor model. **Methods:** The aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles were analyzed as to their stability in aqueous medium and their heating potential through specific absorption rate, when submitted to magnetic hyperthermia with different frequencies and intensities of alternating magnetic field. In magnetic hyperthermia *in vitro* assays, the C6 cells cultured and transduced with luciferase were analyzed by bioluminescence in the absence/presence of alternating magnetic field, and also with and without aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. In the *in vivo* study, the measurement of bioluminescence was performed 21 days after glioblastoma induction with C6 cells in rats. After 24 hours, the aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles were implanted in animals, and magnetic hyperthermia was performed for 40 minutes, using the best conditions of frequency and intensity of alternating magnetic field tested in the *in vitro* study (the highest specific absorption rate value) and verified the difference of bioluminescence before and after magnetic hyperthermia. **Results:** The aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles were stable, and their heating capacity increased along with higher frequency and intensity of alternating magnetic field. The magnetic hyperthermia application with 874kHz and 200 Gauss of alternating magnetic field determined the best value of specific absorption rate (194.917W/g). When these magnetic hyperthermia parameters were used in *in vitro* and *in vivo* analysis, resulted in cell death of 52.0% and 32.8%, respectively, detected by bioluminescence. **Conclusion:** The magnetic hyperthermia was promising for the therapeutical process of glioblastoma tumors in animal model, using aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles, which presented high specific absorption rate.

**Keywords:** Glioblastoma/therapy; Magnetic, hyperthermia; Nanoparticles; Magnetite nanoparticles; Cell tracking/methods; Aminosilane; Tumoral model; Rats

## INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) compreende 47,7% de todos os tumores malignos cerebrais, e apenas 5,6% dos pacientes acometidos sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico, de acordo com o relatório estatístico da *Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)*,<sup>(1)</sup> apresentando prognóstico ainda bastante limitado. O GBM representa uma das doenças mais devastadoras do sistema nervoso central, devido ao seu comportamento extremamente agressivo, e não tem respostas satisfatórias às diversas modalidades terapêuticas até os dias atuais.<sup>(2)</sup>

Estudos pré-clínicos em tumores de GBM permitiram entender e avaliar as diferentes estratégias para o processo terapêutico.<sup>(3,4)</sup> Dentre os modelos pré-clínicos de indução tumoral,<sup>(5)</sup> os que utilizam células C6 apresentam vantagens, devido aos aspectos histológicos e a suas similaridades com os achados em humanos, como:

polimorfismo nuclear, alto índice de mitose, focos de necrose tumoral, hemorragia intratumoral, invasão do parênquima e neoangiogênese.<sup>(5,6)</sup>

Como atualmente não há tratamento eficaz para o GBM, mecanismos terapêuticos alternativos vêm sendo desenvolvidos,<sup>(7)</sup> como a técnica de magneto-hipertermia (MHT). Sua relevância resulta dos efeitos antitumorais significativos em modelos de GBM;<sup>(8,9)</sup> e também em outros tipos de tumores.<sup>(10,11)</sup> Na técnica de MHT, as nanopartículas magnéticas, ao serem direcionadas ao tumor e expostas a um campo magnético alternado (CMA) com frequências de intensidades apropriadas, são aquecidas até alcançarem temperatura terapêutica de 42 a 45°C,<sup>(12)</sup> capaz de afetar a massa tumoral sem prejudicar o tecido normal circunjacente.<sup>(9)</sup>

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (NSOF) têm grande potencial para serem aplicadas na técnica de MHT, fundamentadas em suas propriedades magnéticas de transformação de energia, gerando aquecimento.<sup>(9)</sup> Estudos pré-clínicos mostraram a eficácia de diversos tamanhos e coberturas biocompatíveis de NSOF,<sup>(13)</sup> embora em muitos desses estudos a eficácia da MHT tenha sido avaliada em modelos de tumores de GBM induzido no flanco do animal, ao invés de indução intracerebral.<sup>(13)</sup> As aplicações, tanto das células indutoras do tumor quanto das NSOF, por meio de estereotaxia, são as opções mais adequadas para a representação de um modelo de GBM submetido a tratamento de MHT e que mimetiza o que acontece realmente, além da necessidade de colocar uma grande quantidade de NSOF localizada no tumor, para aumentar o potencial de aquecimento da termoterapia.<sup>(14)</sup>

Há alguns aspectos que ainda precisam ser avaliados com relação à eficácia da terapia da MHT, como propriedades físico-químicas das nanopartículas, cobertura, tamanho, tipo de nanopartícula magnética, parâmetros do CMA (frequência e intensidade de campo oscilante), concentração de nanopartículas, tempo de aplicação da MHT, assim como poucos estudos em modelos de GBM intracerebral.<sup>(8,13)</sup> Uma das nanopartículas magnéticas que apresenta grande potencial é a NSOF recoberta com aminosilana (NSOF<sub>Amin</sub>), por apresentar maior valor de magnetização de saturação (790,93 A/m), o que influencia na capacidade de aquecimento, em comparação com NSOF recobertas com outros materiais – por exemplo carboximetildextrana (227,13 A/m).<sup>(15)</sup> Utilizando as NSOF<sub>Amin</sub> em ensaios com MHT, Jordan et al.,<sup>(9)</sup> mostraram que as NSOF possibilitaram a formação de depósitos mais estáveis de nanopartículas em volta de todo o tumor, em comparação às NSOF com revestimento de dextrana. Além disso, estas

NSOF<sub>Amin</sub> foram avaliadas e usadas para aplicações clínicas em pacientes com tumores,<sup>(16)</sup> além de não terem infligido danos em neurônios corticais em estudos de modelo animal.<sup>(17)</sup>

Neste sentido, o presente trabalho busca elucidar *in vitro* e *in vivo* as propriedades das NSOF recobertas com aminosilana associadas aos diferentes parâmetros da MHT na eficiência terapêutica do GBM em modelos pré-clínico. Para tal, avaliamos as características do CMA apropriado para MHT aplicado na terapia de tumores de GBM devido à eficiência no aquecimento das NSOF<sub>Amin</sub>, resultante da intensidade de campo magnético e da frequência de oscilação, assim como a avaliação da eficácia da terapia de MHT *in vitro* e *in vivo*, mediante a técnica de bioluminescência (BLM).

## OBJETIVO

Avaliar o potencial da técnica de magneto-hipertermia utilizando nanopartículas de óxido de ferro recobertas com aminosilana em modelo de tumores de glioblastoma.

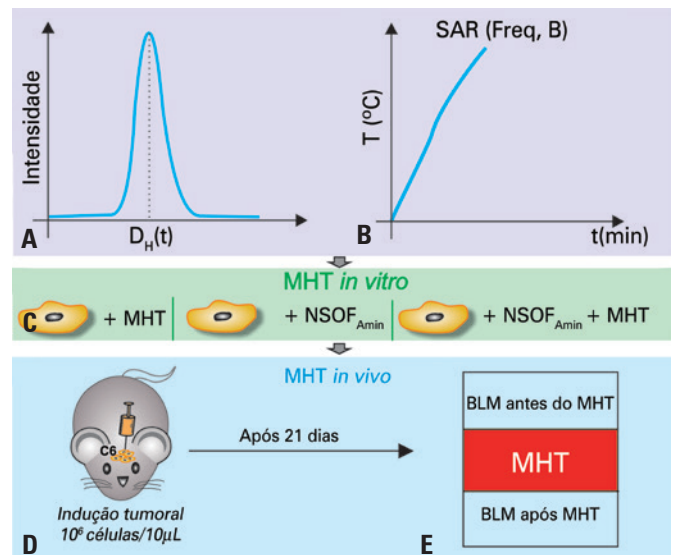
## MÉTODOS

### Desenho experimental

Este estudo foi desenvolvido em três etapas. Na primeira etapa, foram realizados testes da estabilidade do tamanho hidrodinâmico (Figura 1A) e do potencial de transformação de energia magnética em térmica das NSOF<sub>Amin</sub>, utilizando diferentes frequências e intensidades de campo magnético, obtendo, a partir das curvas de aquecimento, encontramos a taxa de absorção específica (SAR - *specific absorption rate*) (Figura 1B). Na segunda etapa, testes *in vitro* objetivaram verificar a viabilidade das células C6 com e sem a aplicação da MHT na presença e na ausência de NSOF<sub>Amin</sub> (Figura 1C). Na terceira etapa, foram realizados ensaios de MHT *in vivo*, iniciando com a indução tumoral de GBM intracerebral em ratos, por meio da aplicação de  $10^6$  células C6 por estereotaxia (Figura 1D) seguida da avaliação tumoral por BLM pré e pós-aplicação da técnica de MHT (Figura 1E), que se utilizou dos parâmetros estabelecidos na primeira e na segunda etapas.

### Nanopartículas magnéticas

Foram utilizadas NSOF<sub>Amin</sub> com núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Chemicell, Berlin, Germany), com densidade de  $\sim 1,25\text{g/cm}^3$ , acopladas ao grupo funcional amino ( $\text{NH}_2$ ), diâmetro hidrodinâmico (DH) de 100nm e potencial zeta +20mV.



T: temperatura; t: tempo: min: minutos; B: Intensidade de campo magnético; Amin: aminosilana; BLM: bioluminescência.

**Figura 1.** Etapas do desenho experimental. (A-B) A primeira etapa compreendeu a avaliação da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico [ $D_H(t)$ ] temporalmente e do potencial de transformação de energia magnética em térmica das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana (NSOF<sub>Amin</sub>) obtendo-se as taxas de absorção específica (SAR) em função da frequência de oscilação (Freq) e intensidade do campo magnético (B). (C) Na segunda etapa, os estudos *in vitro* analisaram a viabilidade das células C6 com e sem a aplicação da magneto-hipertermia (MHT) e na presença e ausência de NSOF<sub>Amin</sub>. (D) Na terceira etapa, foi induzido o modelo do tumor de glioblastoma (aplicação intracerebral de  $10^6$  células C6 por estereotaxia), (E) para sua posterior aplicação da técnica de MHT após 21 dias da indução tumoral e avaliação da eficácia da terapia mediante a técnica de bioluminescência (BLM), antes e após MHT

### Distribuição do tamanho das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana

Para avaliar a polidispersão do DH e a estabilidade das NSOF<sub>Amin</sub>, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (ELD) mediante o sistema Zetasizer Nano S (Malvern, UK). A avaliação foi realizada na concentração de  $100\text{mgFe/mL}$ , sendo coletados os dados a  $25^\circ\text{C}$ , por um período de equilíbrio de 60 segundos, com registros de 30 em 30 minutos durante 24 horas.

### Potencial de aquecimento das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana no sistema de magneto-hipertermia

Para determinar o potencial de aquecimento das NSOF<sub>Amin</sub> mediante a técnica de MHT foi utilizado um sistema de CMA modelo DM100 (nB nanoScale Biomagnetics), combinando quatro frequências (309, 557, 715 e  $874\text{kHz}$ ) e cinco intensidades de campo magnético (100, 125, 150, 175 e 200 Gauss) para obtenção das curvas de aquecimento.

Foram utilizados 100 $\mu$ L de NSOF<sub>Amin</sub> na concentração de 5mg/mL, dispersas em meio aquoso, alocado em um recipiente isolado termicamente. A temperatura das NSOF<sub>Amin</sub> foi monitorada por sistema de fibra óptica (Luxtron 3204), iniciando todas as análises em 19°C.

As curvas de aquecimento obtidas foram utilizadas para calcular os valores da SAR em W/g, para cada frequência e campo magnético aplicado, de acordo com a equação 1:

$$SAR = C_{\text{água}} \frac{\Delta T / \delta t}{C_{\text{Fe}}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $C_{\text{água}}$  é o calor específico da água,  $\Delta T / \delta t$  é a inclinação inicial da temperatura em °C/s, e  $C_{\text{Fe}}$  é a concentração de ferro em g/mL.

## Estudo *in vitro*

### Cultura celular das C6

A linhagem celular C6 foi cultivada em meio RPMI (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, EUA), e incubado a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>), até atingir confluência de 70%, sendo tripsinizada para ser utilizada nos ensaios propostos.

As células C6 foram transduzidas com vetor lentiviral de luciferase conforme protocolo já estabelecido,<sup>(18)</sup> resultando na obtenção de células transfectadas com luciferase para a avaliação da terapia mediante a técnica de BLM.

### Avaliação da magneto-hipertermia *in vitro*

Amostras contendo 10<sup>6</sup> células C6 suspensas em 200 $\mu$ L de RPMI 10% SFB foram avaliadas em quatro condições em triplicata: células C6 (Grupo Controle), células C6 marcadas com NSOF<sub>Amin</sub>, células C6 submetidas à MHT e células C6 marcadas com NSOF<sub>Amin</sub> submetidas à MHT. A marcação das C6 com NSOF<sub>Amin</sub> foi realizada com 600mg Fe/mL por 18 horas. Nas amostras submetidas à MHT, foram utilizados os parâmetros de 200 Gauss e 874kHz por um período de 40 minutos. A eficiência da técnica de MHT (viabilidade celular) foi avaliada mediante a técnica de BLM para o qual foi adicionada 100 $\mu$ L de luciferina em cada amostra e a posterior aquisição de imagens utilizando o equipamento IVIS Lumina III (Xenogen Corp, EUA).

## Estudo *in vivo*

### Animais

Foram utilizados dez ratos Wistar machos com 2 meses de idade (de 290 a 350g). Os animais foram aclimatados no Centro de Experimentação e Treinamento em

Cirurgia (CETEC) do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (CEUA 3126-17). Este biotério é acreditado pela *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* (AAALAC), sendo os animais alojados em caixas individuais forradas com serragem autoclavada, com água e ração balanceada *ad libitum*, obedecendo um ciclo claro-escuro de 12 horas (7h às 19h), com temperatura de 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), conforme especificações internacionais.

### Indução tumoral de glioblastoma com células C6

Os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/kg) e xilasina (12mg/kg). O implante de células C6 (10<sup>6</sup>/10 $\mu$ L de meio de cultura) foi realizado por estereotaxia, conforme protocolo já estabelecido.<sup>(6)</sup> O ponto de implantação das células no córtex frontal direito foi determinado e marcado sobre a tábua óssea, seguindo orientações do atlas estereotáxico de Swanson:<sup>(19)</sup> antero-posterior = 2,0mm; látero-lateral = 2,0mm; profundidade = 2,5mm.

### Ensaio do processo de magneto-hipertermia no modelo animal

Os ensaios de MHT *in vivo* foram realizados após 21 dias de indução do tumor. Este estagiamento tumoral de aplicação teve como base trabalhos anteriores do grupo.<sup>(20,21)</sup>

A avaliação tumoral controle antes de ser submetida ao processo de MHT foi realizada no 21º dia, mediante a técnica de BLM, utilizando o equipamento IVIS, sendo os animais mantidos com anestesia inalatória de isoflurano (saturação de 2%) no fluxo de 2,5L/min de oxigênio. O sinal de BLM foi adquirido após 5 minutos da administração de 100 $\mu$ L de solução de luciferina (1mM em PBS).

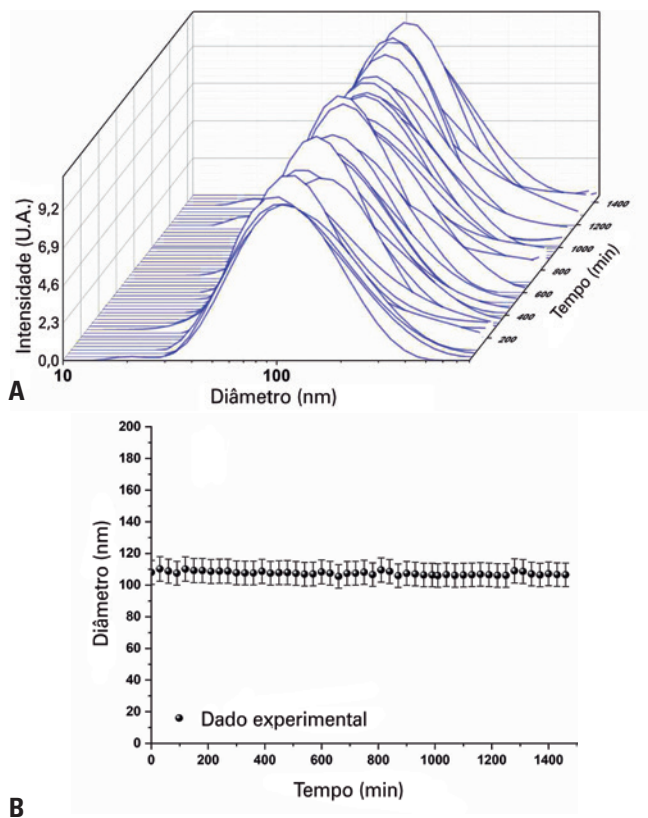
No 22º dia após a indução tumoral, foram aplicados 50 $\mu$ g de Fe contidos em 10 $\mu$ L da suspensão coloidal de NSOF<sub>Amin</sub>, divididos em quatro pontos equidistantes 3mm, a partir da região central da massa tumoral, utilizando o equipamento de estereotaxia. Após 20 minutos da aplicação das NSOF<sub>Amin</sub>, os animais foram dispostos dentro da bobina do equipamento de MHT e submetidos ao planejamento de aquecimento, composto de duas partes. Na primeira parte, foi utilizada frequência de 874kHz e campo de 200 Gauss, até atingir os 42°C e, na segunda, foi mantida a frequência e modulada a intensidade do campo, para manter a temperatura a 42°C, totalizando um período de 40 minutos de MHT. O mapeamento da temperatura intratumoral foi mensurado com fibra óptica (Luxtron 3204) com sondas de temperatura (diâmetro de 0,55mm).

Após a aplicação da MHT, os animais foram reavaliados por meio do BLM e, assim, foi determinada a diferença do sinal entre as imagens antes e após terapia em fótons/s.

## I RESULTADOS

### Espalhamento de luz dinâmico

As medidas de estabilidade realizadas mediante a técnica de ELD nas NSOF<sub>Amin</sub> dispersas em água são mostradas na figura 2. As curvas da figura 2A indicam que as NSOF<sub>Amin</sub> foram polidispersas no tamanho hidrodinâmico, e o pico de intensidade máxima correspondente ao DH médio foi de  $110 \pm 5 \text{ nm}$ , sem diferença significativa entre as medidas ( $p > 0,05$ ) adquiridas em 24 horas. Assim, foi possível considerar as NSOF<sub>Amin</sub> estáveis durante o período analisado, como mostrado na figura 2B.



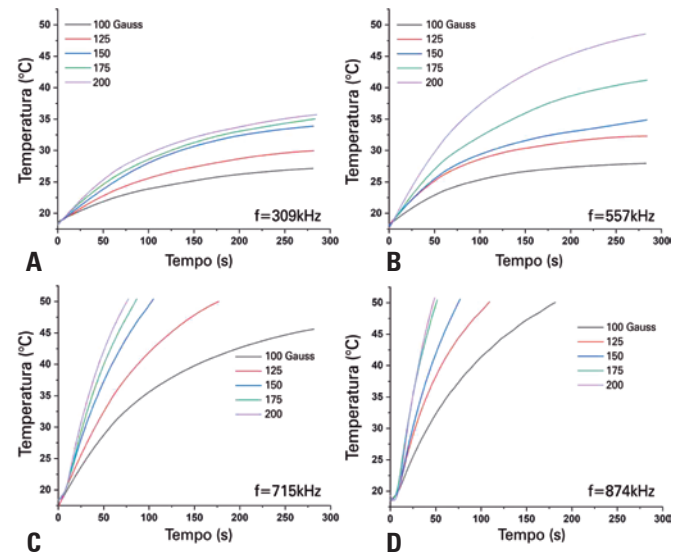
UA: unidades arbitrárias.

**Figura 2.** Estabilidade das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana. (A) Polidispersão do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana durante um período de 24 horas. (B) Valores do diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ )

### Capacidade de aquecimento das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana

As curvas de aquecimento das NSOF<sub>Amin</sub> obtidas quando submetidas ao CMA são mostradas na figura 3. A avaliação do aquecimento mostra que, para amostras submetidas à intensidades de CMA variando de 100 a 200 Gauss, para frequências fixas, a temperatura de

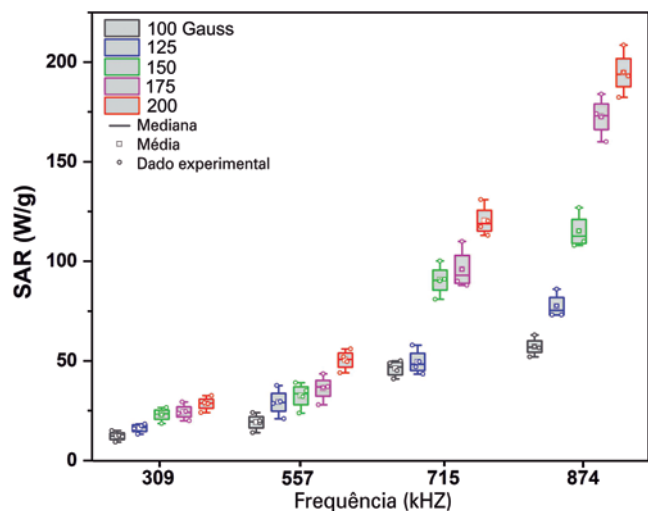
aquecimento se incrementou com o aumento do campo magnético (Figura 3A a 3D), como também com a elevação das frequências. O tempo de aquecimento também diminuiu com o uso de frequência e CMA altos (Figura 3D). Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana dispersas em meio aquoso sob ação de CMA de 200 Gauss e 874kHz forneceram maior aquecimento em relação aos outros parâmetros, e a temperatura atingiu  $50^\circ\text{C}$  em menos de 50 segundos (Figura 3D).



**Figura 3.** Curvas de aquecimento das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana mostrando o incremento da temperatura em função do tempo, para amostras submetidas à intensidades de campo magnético alternado de 100, 125, 150, 175 e 200 Gauss e frequências de (A) 309kHz, (B) 557kHz, (C) 715kHz e (D) 874kHz

### Cálculo da taxa de absorção específica

A análise da SAR (Figura 4) foi realizada a partir das curvas de aquecimento obtidas anteriormente (Figura 3). A exposição das NSOF<sub>Amin</sub> a 874kHz e 200 Gauss proporcionou a SAR mais elevada ( $194,917 \text{ W/g}$ ) entre todas as análises (Figura 4). A tabela 1 mostra os valores da SAR em cada análise aplicada, e a SAR dependeu da intensidade do CMA e da frequência. O valor da SAR medido em 200 Gauss na faixa de frequência de 309 a 874kHz se incrementou de 28,5 até  $194,7 \text{ W/g}$ , sendo significativo ( $p < 0,001$ ) em relação às frequências analisadas, como também os campos analisados ( $p < 0,001$ ), pois, no caso da SAR medida em 874kHz na faixa de campo magnético de 100 a 200 Gauss, houve incremento de 57,2 até  $194,7 \text{ W/g}$ . Assim, os valores da SAR se elevaram na medida em que os parâmetros estabelecidos de frequência e intensidade do campo magnético também se elevaram, sendo significativos os resultados apresentados na interação entre ambos os parâmetros ( $p < 0,001$ ).



SAR: taxa de absorção específica.

**Figura 4.** Taxa de absorção específica das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana submetidas a intensidades de campo magnético alternado de 100 (preto), 125 (azul), 150 (verde), 175 (rosa) e 200 Gauss (vermelho) para frequências de 309, 557, 715 e 874kHz

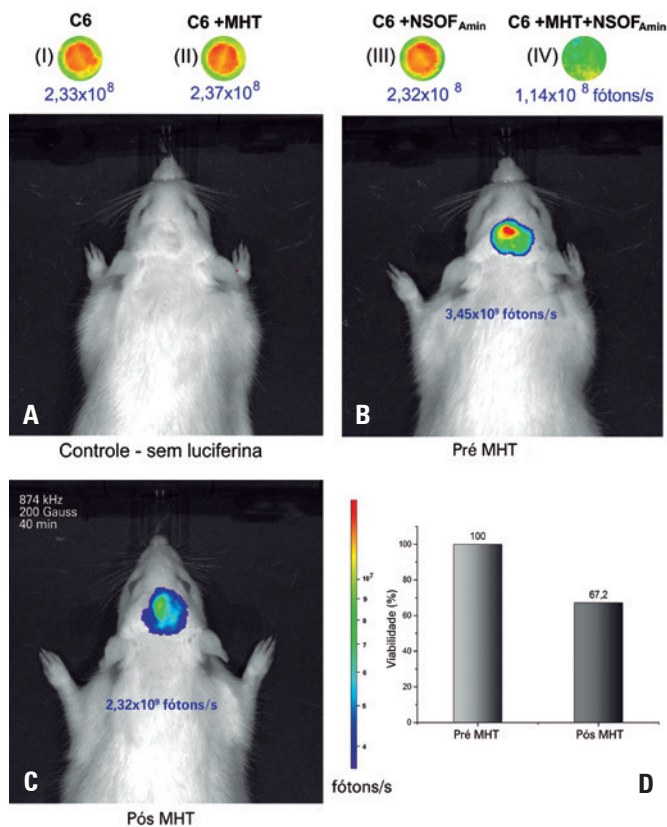
**Tabela 1.** Valores da taxas de absorção específica calculados para nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana sob ação de campo magnético alternado de 100, 125, 150, 175 e 200 Gauss para 309, 557, 715 e 874kHz

Frequência do CMA (kHz)	Intensidade do CMA (Gauss)	SAR (W/g)
309	100	12,2±2,4
	125	16,2±2,2
	150	23,0±3,4
	175	24,4±3,9
	200	28,5±3,5
557	100	19,2±4,1
	125	29,2±6,8
	150	32,5±6,4
	175	36,3±6,4
	200	50,4±5,0
715	100	46,2±4,1
	125	49,4±6,2
	150	90,6±7,9
	175	96,0±9,9
	200	120,4±7,7
874	100	57,2±4,5
	125	77,4±6,1
	150	115,1±8,5
	175	172,6±9,8
	200	194,7±10,8

Pela análise de variância, foi verificada diferença significativa entre os campos, entre as frequências e na interação entre campos e frequências, com valor de  $p < 0,001$ . Os dados foram testados previamente, quanto à distribuição. CMA: campo magnético alternado. SAR: taxa de absorção específica.

### Avaliação da magneto-hipertermia *in vitro*

As células C6 do Grupo Controle, quando observadas pela imagem de BLM, apresentaram intensidade de  $2,33 \times 10^8$  fótons/s (Figura 5I), não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação tanto à intensidade de BLM das células C6 submetidas à MHT (200 Gauss e 874kHz) na ausência de NSOF<sub>Amin</sub> ( $2,37 \times 10^8$  fótons/s) (Figura 5II) quanto à intensidade de BLM das células C6 na presença apenas das NSOF<sub>Amin</sub> ( $2,32 \times 10^8$  fótons/s) (Figura 5III). Esses resultados indicaram que nem o CMA nem as NSOF<sub>Amin</sub>, por si só, interferiram na viabilidade das células C6. Contudo, nas células C6 em que foram aplicadas MHT na presença de NSOF<sub>Amin</sub>, observou-se redução de 52% da viabilidade celular comparadas ao controle ( $1,14 \times 10^8$  fótons/s) (Figura 5IV).



**Figura 5.** Avaliação da técnica de magneto-hipertermia (MHT). Foram realizados ensaios *in vitro* (I-IV), em que, comparando-se com as células C6 apenas (I), C6 + MHT (II) e C6 + nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (NSOF<sub>Amin</sub>) (III) e C6 + NSOF<sub>Amin</sub> + MHT (IV), observa-se redução de 52% da intensidade de bioluminescência nas células C6 marcadas com NSOF<sub>Amin</sub> e submetidas à técnica de MHT, não havendo diferença significativa entre as condições (I), (II) e (III). Foram realizados ensaios *in vivo* (A-D). Em A, observa-se que a bioluminescência por si só, sem a aplicação de luciferina, não interfere na captação de sinal de bioluminescência. Em (B) o tumor que se desenvolveu após 21 dias da indução tumoral emitiu um sinal de bioluminescência em relação ao qual, após (C) a aplicação da técnica de MHT (200 Gauss, 874kHz) por 40 minutos, (D) observou-se redução de 32,8%

## Avaliação da técnica de magneto-hipertermia no modelo animal por bioluminescência

No 21º dia após a indução tumoral, a avaliação basal do tumor por BLM sem a aplicação de luciferina mostrou que o equipamento de BLM, por si só, não foi capaz de enviar o resultado da análise (Figura 5A). Após a aplicação de luciferina antes da aplicação do CMA, o sinal registrado do tumor por BLM foi de  $3,45 \times 10^9$  fótons/s (Figura 5B). Após 24 horas, foi aplicada a técnica de MHT (200 Gauss e 874kHz) por 40 minutos, sendo observado decaimento de sinal para  $2,32 \times 10^9$  fótons/s (Figura 5C). Após a aplicação da técnica de MHT utilizando-se as melhores condições de intensidade e frequência de CMA testados previamente *in vitro*, a diminuição da massa tumoral em relação ao controle tumoral foi de 32,8% (Figura 5D).

## DISCUSSÃO

O uso de recursos nanotecnológicos aplicados nas técnicas terapêuticas para os tumores agressivos como o GBM tem apresentado importante papel nos estudos pré-clínicos, principalmente o uso de nanopartículas magnéticas para fins diagnósticos e terapêuticos.<sup>(22)</sup> As NSOF possuem diferentes características físico-químicas que têm diferentes interações biológicas,<sup>(23)</sup> sendo uma delas o DH, no qual a conservação do tamanho, ao longo do tempo, evita a formação de aglomerados, tornando as NSOF mais estáveis<sup>(24)</sup> e, conseqüentemente, mais eficazes na técnica de MHT<sup>(25)</sup> – característica importante e pouco explorada em relação à descrição da estabilidade das NSOF. No presente estudo, a cinética do processo de agregação das NSOF<sub>Amin</sub> monitorado por 24 horas por ELD mostrou que não houve formação de aglomerados, mantendo o DH e sua distribuição polidispersa, características das nanopartículas magnéticas.<sup>(26)</sup>

Após garantir a estabilidade das NSOF<sub>Amin</sub>, o potencial do aquecimento mensurado pela SAR foi avaliado, objetivando o planejamento da temperatura terapêutica. No processo de caracterização das curvas de aquecimento obtidas pelas variações de amplitude e frequência do CMA, é evidenciada uma histerese forçada nas NSOF<sub>Amin</sub>, a qual contribui com a magnetização complexa no aquecimento, assim como os processos eletromagnéticos e térmicos, que influenciam no aquecimento.<sup>(27)</sup> O aquecimento da dispersão aquosa de NSOF<sub>Amin</sub>, quando submetidas a ensaios de MHT, ocorre devido ao arranjo espacial das NSOF<sub>Amin</sub>, que sob a ação do campo magnético, produz mudanças nas interações dipolo-dipolo interpartículas e no movimento *Browniano*.<sup>(28)</sup> Um estudo de revisão mostrou que nanopartículas de magne-

tita com propriedades similares, aplicadas em estudos pré-clínicos, mostraram valores de SAR na faixa de 96 a 286W/g.<sup>(13)</sup> Em aplicações clínicas, valores de SAR estão na faixa de 0,12 até 2.452W/g dependente das características das nanopartículas, bem como de parâmetro experimentais.<sup>(25,29,30)</sup> Portanto, os valores de SAR encontrados em nosso estudo foram condizentes com a literatura, sendo que o maior valor de SAR foi de 194,917W/g para a suspensão coloidal das NSOF<sub>Amin</sub> submetidas ao CMA de 874kHz e 200 Gauss, mostrando-se adequado para a aplicação *in vivo* da terapia da MHT.

Antes da aplicação da MHT *in vivo*, foi constatado, por imagens de BLM nas amostras *in vitro*, que o CMA não influenciou na viabilidade das células C6 na ausência de NSOF<sub>Amin</sub> e nem a viabilidade das células na presença de NSOF<sub>Amin</sub> sem CMA. A técnica de BLM, devido à sua sensibilidade, é utilizada na avaliação do crescimento tumoral e possíveis metástases,<sup>(31)</sup> tendo também boa correlação com outras técnicas de imagem, como a ressonância magnética e a histologia<sup>(27,31)</sup> no monitoramento do crescimento tumoral.

A eficiência da MHT das NSOF<sub>Amin</sub> administradas localmente na massa tumoral pode ser influenciada por diversos fatores, como a dispersão das NSOF<sub>Amin</sub> pelos tecidos circunvizinhos ao local da administração, o que afeta o aquecimento produzido pelas NSOF<sub>Amin</sub> na presença do CMA. Além disso, o aquecimento pode ser influenciado por aspectos fisiológicos, que são implícitos ao cálculo de transferência de calor (equação de Pennes), como metabolismo local, taxa de perfusão sanguínea, coeficiente de transferência de calor dos tecidos envolvidos, massa específica do sangue, entre outros.<sup>(32,33)</sup> Em nosso estudo, obtivemos eficiência de 32,5% com uma única aplicação de MHT, utilizando menor valor de massa de NSOF<sub>Amin</sub> (50µg Fe) em comparação a outros estudos que aplicaram na faixa de 0,5 a 3mg Fe nos tumores de glioma induzidos no flanco ou regiões subcutâneas.<sup>(13)</sup> Utilização de altas concentrações de nanopartículas de ferro pode causar toxicidade aos tecidos vizinhos, bem como afetar outros órgãos vinculados na biodistribuição e na eliminação das nanopartículas através do fígado, rins e baço.<sup>(34)</sup>

Como limitação do estudo, podemos ressaltar que a eficiência da MHT verificada pela viabilidade celular não foi testada com tempo menor de aplicação do CMA e nem seu efeito ao longo do tempo.

Os estudos pré-clínicos da MHT mostram resultados promissores quando combinada com outra terapia, como radioterapia ou quimioterapia.<sup>(35)</sup> No entanto, há desafios a serem superados, para aumentar a eficiência da MHT visando à aplicação clínica. O aumento da eficiência da terapia da MHT depende da determinação

prévia de parâmetros do CMA, que produz o valor adequado da SAR do nanomaterial, assim como da avaliação adequada *in vitro* e *in vivo*, mediante técnicas de imagem molecular, como a BLM. Finalmente podemos afirmar que a NSOF<sub>Amin</sub> tem potencial para a terapia de MHT no tratamento de tumores de GBM.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o potencial da técnica de magneto-hipertermia usando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana para o tratamento de glioblastoma no modelo animal. O valor da taxa de absorção específica caracterizado para as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana submetidas a ação de campo magnético alternado indica boa capacidade de aquecimento para atingir a temperatura. A técnica de bioluminescência mostrou, após aplicação da terapia da técnica de magneto-hipertermia, redução da viabilidade celular em 32,8% no estudo *in vitro* e 52% no estudo *in vivo*. Portanto, a aplicação da técnica de magneto-hipertermia se mostra promissora para o processo terapêutico de tumores de glioblastoma utilizando as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro recobertas com aminosilana, que evidencia características magnéticas favoráveis para o processo de magneto-hipertermia, mas é necessária avaliação cuidadosa de outros parâmetros envolvidos, como propriedades magnéticas, polidispersão das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, morfologia, dose aplicada das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, local de administração e aplicações periódicas da terapia entre outros.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à equipe do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia e ao Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

## INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Rego GN: <http://orcid.org/0000-0003-2011-0373>  
 Mamani JB: <http://orcid.org/0000-0001-5038-0070>  
 Souza TK: <http://orcid.org/0000-0001-9931-5296>  
 Nucci MP: <http://orcid.org/0000-0002-1502-9215>  
 Silva HR: <http://orcid.org/0000-0002-1173-745X>  
 Gamarra LF: <http://orcid.org/0000-0002-3910-0047>

## REFERÊNCIAS

- Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro-oncol.* 2018;20 suppl\_4:iv1-86.
- Davis ME. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016;20(5 Suppl):S2-8. Review.
- Chen L, Zhang Y, Yang J, Hagan JP, Li M. Vertebrate animal models of glioma: understanding the mechanisms and developing new therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1836(1):158-65. Review.
- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. *Trends Mol Med.* 2011;17(6):301-12. Review.
- Barth RF, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol.* 2009;94(3):299-312. Review.
- da Silva AC, Cabral FR, Mamani JB, Malheiros JM, Polli RS, Tannus A, et al. Tumor growth analysis by magnetic resonance imaging of the C6 glioblastoma model with prospects for the assessment of magnetohyperthermia therapy. *einstein (São Paulo).* 2012;10(1):11-5.
- Shergalis A, Bankhead A 3rd, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. *Pharmacol Rev.* 2018;70(3):412-45.
- Mahmoudi K, Bouras A, Bozec D, Ivkov R, Hadjipanayis C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. *Int J Hyperthermia.* 2018; 34(8):1316-28.
- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem FK, Waldoefner N, Teichgraber U, et al. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol.* 2006;78(1):7-14.
- Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Krause J, Włodarczyk W, et al. Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma *in vivo*. *Int J Hyperthermia.* 1997;13(6):587-605.
- Johannsen M, Jordan A, Scholz R, Koch M, Lein M, Deger S, et al. Evaluation of magnetic fluid hyperthermia in a standard rat model of prostate cancer. *J Endourol.* 2004;18(5):495-500.
- Shaterabadi Z, Nabiyouni G, Soleymani M. Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018;133:9-19. Review.
- Silva AC, Oliveira TR, Mamani JB, Malheiros SM, Malavolta L, Pavon LF, et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:591-603. Review.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011;103(2):317-24.
- Yuan Y, Tasciuc DA. Comparison between experimental and predicted specific absorption rate of functionalized iron oxide nanoparticle suspensions. *J Magn Magn Mater.* 2011;323(20):2463-9.
- Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007;81(1):53-60.
- Rivet CJ, Yuan Y, Gilbert RJ, Borca-Tasciuc DA. Effect of magnetic nanoparticle heating on cortical neuron viability. *Int J Hyperthermia.* 2014;30(2):79-85.
- Fantacini DM, Picanço-Castro V. Production of recombinant factor VIII in human cell lines. *Methods Mol Biol.* 2018;1674:63-74.
- Swanson L. *Brain maps: structure of the rat brain.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 1992.
- Mamani JB, Malheiros JM, Cardoso EF, Tannús A, Silveira PH, Gamarra LF. *In vivo* magnetic resonance imaging tracking of C6 glioma cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *einstein (São Paulo).* 2012; 10(2):164-70.



21. Souza TK, Nucci MP, Mamani JB, da Silva HR, Fantacini DM, de Souza LE, et al. Image and motor behavior for monitoring tumor growth in C6 glioma model. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201453.
22. Fernandez-Fernandez A, Manchanda R, McGoron AJ. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;165(7-8):1628-51. Review.
23. Treuel L, Eslahian KA, Docter D, Lang T, Zellner R, Nienhaus K, et al. Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(29):15053-67.
24. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev*. 2015;44(17):6287-305.
25. Abenojar EC, Wickramasinghe S, Bas-Concepcion J, Samia AC. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International*. 2016;26(5):440-8.
26. Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):381.
27. Soetaert F, Kandala SK, Bakuzis A, Ivkov R. Experimental estimation and analysis of variance of the measured loss power of magnetic nanoparticles. *Sci Rep*. 2017;7(1):6661.
28. Branquinho LC, Carrião MS, Costa AS, Zufelato N, Sousa MH, Miotto R, et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. *Sci Rep*. 2013;3(1):2887. Erratum in: *Sci Rep*. 2014;4:3637.
29. Jeon S, Hurley KR, Bischof JC, Haynes CL, Hogan CJ. Quantifying intra- and extracellular aggregation of iron oxide nanoparticles and its influence on specific absorption rate. *Nanoscale*. 2016;8(35):16053-64.
30. Orsinia NJ, Babić-Stojića B, Spasojevića V, Calatayud MP, Cvjetičanin N, Goya GF. Magnetic and power absorption measurements on iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition of Fe(acac)<sub>3</sub>. *J Magn Magn Mater*. 2018;449:286-96.
31. Adisheshaiah PP, Patel NL, Ileva LV, Kalen JD, Haines DC, McNeil SE. Longitudinal imaging of cancer cell metastases in two preclinical models: a correlation of noninvasive imaging to histopathology. *Int J Mol Imaging*. 2014;2014:102702.
32. Attar MM, Haghpanahi M, Amanpour S, Mohaqeq M. Analysis of bioheat transfer equation for hyperthermia cancer treatment. *J Mech Sci Technol*. 2014;28(2):763-71.
33. Giordano MA, Gutierrez G, Rinaldi C. Fundamental solutions to the bioheat equation and their application to magnetic fluid hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2010;26(5):475-84.
34. Patil US, Adireddy S, Jaiswal A, Mandava S, Lee BR, Chrissey DB. In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation and Quantification of Iron Oxide Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):24417-50. Review.
35. Chang D, Lim M, Goos JA, Qiao R, Ng YY, Mansfeld FM, et al. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: potential and Limitations. *Front Pharmacol*. 2018;9:831. Review.