

# Monitoramento *in vivo* por imagem por ressonância magnética de células C6 de glioma marcadas com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

## *In vivo* magnetic resonance imaging tracking of C6 glioma cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Javier Bustamante Mamani<sup>1</sup>, Jackeline Moraes Malheiros<sup>2</sup>, Ellison Fernando Cardoso<sup>3</sup>, Alberto Tannús<sup>2</sup>, Paulo Henrique Silveira<sup>1</sup>, Lionel Fernel Gamarra<sup>1</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Realizar monitoramento temporal por imagem por ressonância magnética da migração de células C6 marcadas com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro utilizadas na indução de tumor de glioblastoma no modelo animal, com o intuito de auxiliar no prognóstico e na terapêutica de tumores. **Métodos:** Para o modelo animal de indução de tumor, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em dois grupos. No primeiro grupo (n=3), o tumor foi induzido por células C6 marcadas com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e, no segundo grupo, (n=3) o tumor foi induzido por C6 não marcadas. Foi realizada análise *in vitro* da distribuição intracelular das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro nas células C6 mediante coloração de azul da prússia. As células C6 para a indução de tumor foram implantadas no córtex frontal direito. Posteriormente, foram realizados o monitoramento tumoral e a detecção das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro por sequências de imagem por ressonância magnética ponderadas em  $T_2$  e  $T_2^*$ , em campo de 2T. Após os estudos de imagem por ressonância magnética, o tecido tumoral foi submetido à análise histológica. **Resultados:** A avaliação qualitativa do estudo *in vitro* mostrou boa distribuição e satisfatória marcação celular com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. No monitoramento realizado por imagem por ressonância magnética, foi observada, no 14º e 21º dia, redução do sinal em  $T_2$  e  $T_2^*$ , induzida pelas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, na lesão localizada no lobo frontal esquerdo em topografia parasagital. Por meio da marcação com azul da prússia, a análise histológica do tecido tumoral revelou que, nas células C6, ainda encontramos uma vasta distribuição das nanopartículas superparamagnéticas de

óxido de ferro. **Conclusão:** A imagem por ressonância magnética apresenta-se com alto potencial para o monitoramento das células C6 marcadas eficientemente com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro na avaliação do crescimento tumoral.

**Descritores:** Glioma; Nanopartículas; Imagem por ressonância magnética; Modelos animais

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the current study was to monitor the migration of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION)-labeled C6 cells, which were used to induce glioblastoma tumor growth in an animal model, over time using magnetic resonance imaging (MRI), with the goal of aiding in tumor prognosis and therapy. **Methods:** Two groups of male Wistar rats were used for the tumor induction model. In the first group (n=3), the tumors were induced via the injection of SPION-labeled C6 cells. In the second group (n=3), the tumors were induced via the injection of unlabeled C6 cells. Prussian Blue staining was performed to analyze the SPION distribution within the C6 cells *in vitro*. Tumor-inducing C6 cells were injected into the right frontal cortex, and subsequent tumor monitoring and SPION detection were performed using  $T_2$ - and  $T_2^*$ -weighted MRI at a 2T field strength. In addition, cancerous tissue was histologically analyzed after performing the MRI studies. **Results:** The *in vitro* qualitative evaluation demonstrated adequate distribution and satisfactory cell labeling of the SPIONs. At 14 or 21 days after C6 injection, a SPION-induced  $T_2$ - and  $T_2^*$ -weighted MRI signal reduction was observed within the lesion located in the left frontal lobe on parasagittal

Trabalho realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; com colaboração do Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – USP, São Carlos (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Diagnóstico por Imagem e Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Javier Bustamante Mamani – Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel: (11) 2151-2044 – E-mail: javierbm@einstein.br

Data de submissão: 5/4/2012 – Data de aceite: 23/5/2012

Conflito de interesse: não há.

topography. Moreover, histological staining of the tumor tissue with Prussian Blue revealed a broad distribution of SPIONs within the C6 cells. **Conclusion:** MRI analyses exhibit potential for monitoring the tumor growth of C6 cells efficiently labeled with SPIONs.

**Keywords:** Glioma; Nanoparticles; Magnetic resonance imaging; Animal models

## INTRODUÇÃO

Um tumor cerebral é uma massa de células anormais no cérebro que crescem e se multiplicam de maneira descontrolada. Os tumores cerebrais, assim como outros tipos de cânceres, têm prognóstico ruim em razão de mutações genéticas. Em humanos, o glioma é um tipo de tumor comum do sistema nervoso central (SNC) predominantemente constituído de células com características de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendrogliomas), células ependimais (ependimomas), e pela mistura de vários tipos de células gliais (por exemplo, oligoastrocitomas)<sup>(1)</sup>. Sendo os astrocitomas o tipo mais comum de tumor cerebral humano, eles são classificados, de acordo sua malignidade, como astrocitomas, astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme. O glioblastoma multiforme, tumor sólido altamente vascularizado em termos de vasoproliferação, hiperplasia celular endotelial e citologia celular endotelial<sup>(2)</sup>, é um astrocitoma com máximo grau de malignidade, de crescimento rápido, que se espalha rapidamente, invadindo o tecido normal do cérebro e com história clínica de poucos meses. Portanto, há necessidade de melhorar a qualidade de vida de pacientes que possuem tumores cerebrais, o que leva à procura de novas terapias.

Avanços na terapia celular indicam a necessidade do desenvolvimento de técnicas para acompanhar a terapêutica de células transplantadas. A maioria de protocolos de terapia com células requer análise histológica para determinar a viabilidade do enxerto das células transplantadas. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas não invasivas, bem como o estabelecimento de protocolos de terapia para monitoramento em tempo real de células transplantadas, com o intuito de ajudar na aplicação clínica da terapia celular.

A nanotecnologia associada à engenharia de partículas abriu a possibilidade de alvejar células dentro do organismo, para aprimorar as aplicações terapêuticas<sup>(3,4)</sup>. Os avanços na imagem molecular estão possibilitando o monitoramento da migração de células *in vivo* de maneira não invasiva e em tempo real, e a imagem por ressonância magnética (RM) surge como uma ferramenta útil para tais estudos pré-clínicos e clínicos.

Nanopartículas com propriedades magnéticas à base de óxido de ferro estão sendo utilizadas para a marcação de células<sup>(5-7)</sup>. A imagem por RM revela em detalhe informações anatômicas e funcionais, sendo uma das técnicas de escolha em estudos de rastreamento de células *in vivo* por intermédio da utilização de agentes de contraste, tais como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs). O interesse crescente na utilização de agentes de contraste para a visualização da migração e do crescimento de células, tais como células-tronco e células tumorais, torna imagem por RM uma técnica de potencial interesse, proporcionando pesquisas como a capacidade de monitorizar a migração e *homing* das células *in vivo*<sup>(8-11)</sup>.

As células são marcadas por SPIONs tanto em estudos *in vitro* quanto naqueles *in vivo*, induzindo contraste forte em mapas de  $T_2$  e facilitando o monitoramento das células transplantadas. Em imagem por RM ponderadas nos tempos de relaxação  $T_2$  e  $T_2^*$ , as SPIONs aparecem como sinal de vazio ou regiões hipointensas com artefatos associados<sup>(12)</sup>.

## OBJETIVOS

Avaliar o monitoramento temporal por imagem por RM da migração de células C6 marcadas com SPIONs utilizadas na indução de tumor de glioblastoma no modelo animal.

## MÉTODOS

### Animais

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Todos os procedimentos foram conduzidos de forma que fosse utilizado apenas o número mínimo de animais. Adotaram-se medidas para redução de sofrimento e estresse durante o período de experimentos.

Para o modelo C6 foram utilizados ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade, pesando entre 250 e 300g. Os ratos foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo ( $n=3$ ), o tumor foi induzido por células C6 marcadas com SPIONs e, no segundo grupo ( $n=3$ ), o tumor foi induzido por células C6 não marcadas (Grupo Controle). Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Instituto do Cérebro do HIAE, com ração e água *ad libitum*, em gaiolas individuais de polipropileno, forradas com serragem autoclavada, e tampa tipo grade em aço inoxidável, com divisões para ração balanceada e água. Esse biotério é acreditado pela

*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC International)* e obedece a um ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19h), com temperatura ambiente constante de  $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$ , conforme especificações internacionais.

Para a realização das RM, os animais foram transportados ao biotério do Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética para Estudo de Modelos Animais (CIERMag) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos (SP), onde foram mantidos nas mesmas condições supracitadas até a fase final dos experimentos.

### Cultura de células de glioma C6

Células C6 de glioma de ratos Wistar foram cultivadas em meio Dulbecco's Eagle (Gibco®, Gaithersburg, MD), com 20% de soro bovino fetal (Invitrogen) a  $37^\circ\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ), alcançando a confluência de 90%. O meio foi removido e as células foram liberadas para incubação com tripsina (0,04% de tripsina/EDTA). As células foram centrifugadas a 800rpm por 5 minutos, ressuspendidas em meio Dulbecco's a uma concentração final de  $10^5$  células/ $10\mu\text{L}$  e mantidas resfriadas até sua implantação.

### Marcação celular com SPIONs

Para realizar a marcação celular, as células C6 crescidas com uma confluência de 70 a 80% foram incubadas *overnight* (~12h a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) em 20mL de meio de cultura com SPIONs adicionados ao meio na concentração de  $30\mu\text{g Fe/mL}$  na presença do agente de transfecção PLL (*Sigma-Aldrich Chemie GmdH*, Germany), com concentração de PLL de  $1,5\mu\text{g/mL}$ . Após a incubação, o sobrenadante foi retirado, e as células C6 foram lavadas duas vezes com *phosphate buffer solution* PBS para remover as SPIONs extracelulares. As células C6 marcadas com SPIONs foram coletadas com tripsina, para remover as células aderidas, e manualmente contadas na câmara de Newbauer.

### Análise *in vitro* da distribuição intracelular das SPIONs nas células C6

A propriedade de captação das SPIONs pelas células C6 foi avaliada qualitativamente para distribuição e localização intracelular das SPIONs mediante a coloração de azul da prússia (*Prussian Blue Kit from BioPAL*) e sua posterior avaliação qualitativa da captação das SPIONs pelas células mediante à microscopia de luz. A coloração na solução de azul da prússia nas C6 marcadas foi realizada por um período de 2 minutos.

### Implante estereotáxico das células C6

Para o implante das células C6 marcadas com SPIONs, os animais foram anestesiados com cetamina ( $55\text{mg/kg}$ ) e xilazina ( $11\text{mg/kg}$ ). Em seguida, foi feita a tricotomia da região superior da cabeça. O animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (Model 51700, Stoelting Co., EUA) por meio de barras intra-auriculares e dentes incisivos superiores. Após a incisão da pele na região dorsal do crânio e a remoção do periósteo, foi efetuada a trepanação da calota óssea por meio de uma broca dentária. O ponto para implantação das células foi determinado e marcado sobre a tábua óssea seguindo as orientações do Atlas Estereotáxico de Swanson<sup>(13)</sup> seguiu as coordenadas: anteroposterior= $2,0\text{mm}$ ; látero-lateral= $2,0\text{mm}$ ; profundidade= $2,5\text{mm}$ . Para a indução do tumor, foram implantadas células C6 marcadas com SPIONs e não marcadas (Grupo Controle) sendo tal implantação realizada no córtex frontal direito por meio da agulha de uma seringa Hamilton, na concentração de  $10^5$  células em  $10\mu\text{L}$  de meio de cultura, que foi injetado lentamente por um período de 10 minutos. A agulha permaneceu na posição por mais 2 minutos antes da retirada. Para evitar a sucção da solução injetada de volta para a agulha, esta foi suspensa lentamente até a remoção total do cérebro. Em seguida, o plano ósseo foi recomposto com cera óssea e a pele suturada com fio de algodão.

### Monitoramento tumoral e detecção das SPIONs por imagem por RM

Antes da realização de cada sessão de imagens, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina ( $95\text{mg/kg}$ ) e xilazina ( $12\text{mg/kg}$ ).

Imagens por RM foram adquiridas utilizando um magneto supercondutor horizontal com campo 2T (Model 65310HR, Oxford Instruments, Oxfordshire, UK), com um diâmetro interno de 150mm que possui bobinas de gradiente de 16Gauss/cm e que opera em conjunto com um espectrômetro (Biospin, Bruker®, Germany). Esse sistema conta com recepção de banda larga (2 a 400MHz), dois canais de transmissão e quatro canais de recepção e aquisição paralela em quatro canais. Utilizaram-se bobinas de radiofrequência do tipo sela cruzada com diâmetro interno de 56mm.

Para análise morfológica dos encéfalos, foram utilizadas sequências  $T_2$  e  $T_2^*$ . A sequência utilizada para a aquisição das imagens ponderadas por  $T_2$  foi a RARE (do inglês *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*), com parâmetros: TR= $4.000\text{ms}$ , TE= $67,1\text{ms}$ , *rare factor*=6, 24 médias e comprimento de banda de  $12,5\text{KHz}$ , resultando em um tempo de aquisição de cerca de 50 mi-



nutos por animal. O FOV utilizado foi de 40x40mm<sup>2</sup>, com uma matriz de 192x192 pontos, produzindo uma resolução espacial de 208x208mm. Foram utilizadas 26 fatias de 0,5mm de espessura sem espaçamentos entre elas. A sequência utilizada para a aquisição das imagens ponderadas por T<sub>2</sub>\* foi a FLASH 3D (do inglês *Fast Low Angle Shot*), com parâmetros: TR=48ms, TE=6ms, “flip angle” de 35°, 6 médias e comprimento de banda de 25KHz, resultando em um tempo de aquisição de cerca de 45 minutos por animal. O FOV utilizado foi de 40x40x30mm<sup>3</sup> com uma matriz de 192x192x48 pontos, produzindo resolução espacial de 208x208x625mm.

### Análise histológica do tumor: identificação das SPIONs

Após 3 horas da realização do exame de imagem por RM, os animais foram submetidos à análise histológica. Para isso, eles foram anestesiados e perfundidos transcardiacamente com uma solução tampão salina seguida de paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram retirados e mantidos em PFA por 24 horas e, posteriormente, emblocados em parafina. Foram feitas em micrótomo fatias coronais de 4μm, que foram coradas com o protocolo padrão de fucsina básica e, para visualização das SPIONs, foram contracoradas com a técnica de azul da prússia.

### RESULTADOS

A marcação intracelular de células C6 encubadas por SPIONs recobertas com aminosilane na concentração de 30μgFe/mL, na presença do agente de transfecção PLL, foi avaliada qualitativamente mediante a coloração de azul de prússia e, posteriormente, mediante a microscopia de luz. Nas figuras 1A e 1B são mostradas as células não marcadas e as marcadas por SPIONs, respectivamente.

O monitoramento por imagem por RM do desenvolvimento do tumor, utilizando células de glioma C6 marcadas e não marcadas com SPIONs, foi realizado para 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia. As figuras 2 e 3 apresentam um conjunto de imagens obtido pela técnica de imagem por RM após o transplante de células de glioma C6 marcadas e não marcadas com SPIONs. A figura 2 apresenta uma série de imagens por RM ponderada no tempo de relaxação transversal T<sub>2</sub>; nesta figura, são apresentadas as imagens do tumor, denominada de controle, e das células marcadas com SPIONs para períodos de 14 e 21 dias. A figura 3 apresenta as imagens por RM obtidas com sequência de imagem ponderada no tempo de relaxação transversal T<sub>2</sub>\* para os dois períodos em estudo.

A análise das imagens T2 obtidas aos 14 dias de procedimento da amostra de animais com células não

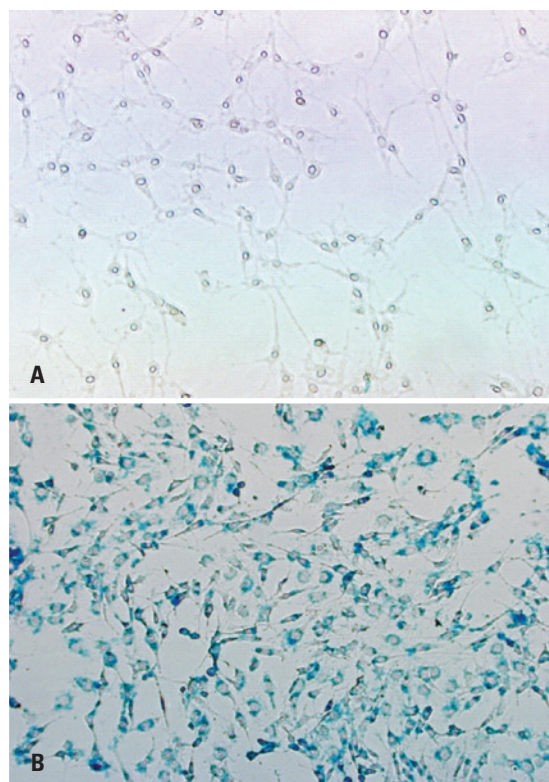


Figura 1. Microscopia de luz das células C6 não marcadas (A) e células C6 marcadas com SPIONs e contracoradas com azul da prússia (B) – aumento 400x

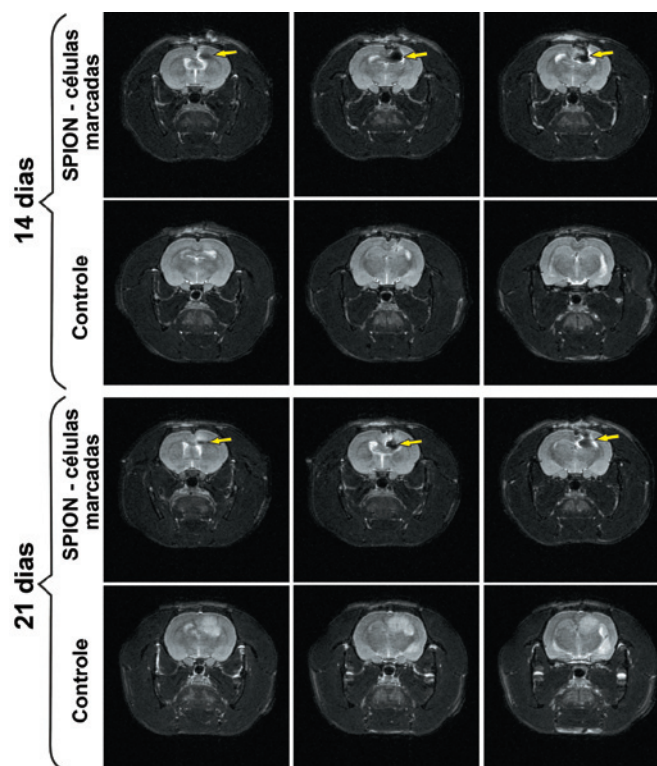
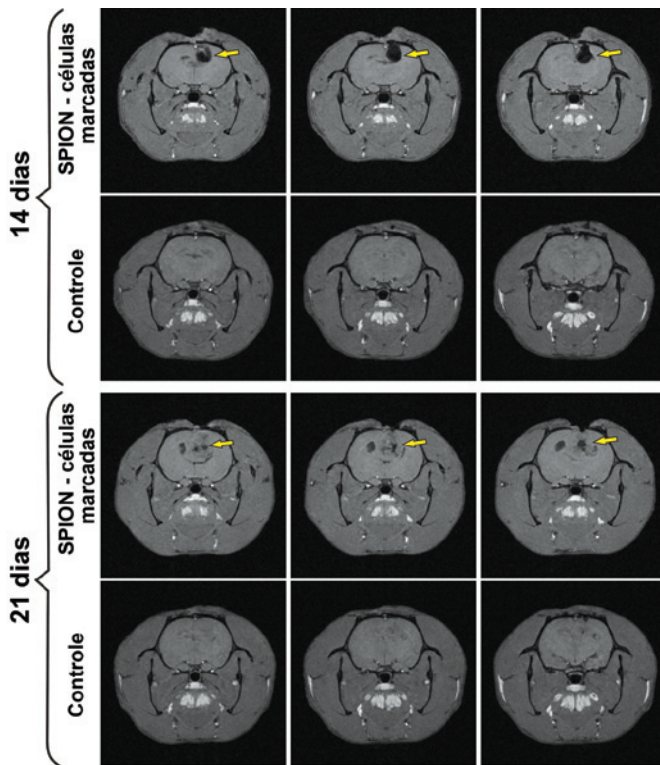


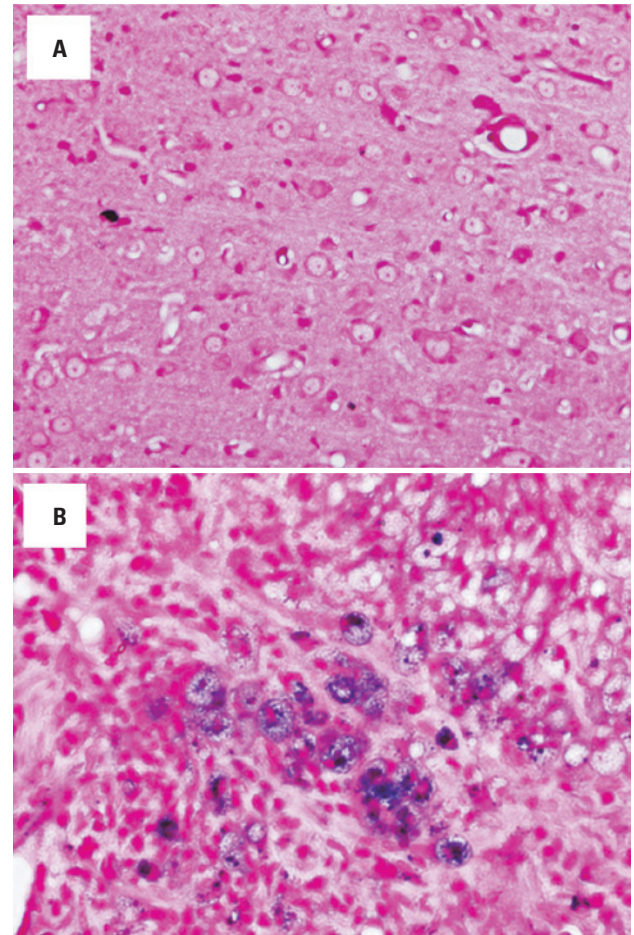
Figura 2. Imagens de ressonância magnética ponderadas em T<sub>2</sub> no desenvolvimento tumoral para os dois grupos em estudo: (i) tumor induzido por C6 marcadas com SPIONs e (ii) por C6 não marcadas (Controle). O estudo foi realizado nos períodos de 14 e 21 dias. As setas indicam o efeito dos SPIONs na imagem de ressonância magnética



**Figura 3.** Imagens de ressonância magnética ponderadas em  $T_2^*$  no desenvolvimento tumoral para os dois grupos em estudo: (i) tumor induzido por C6 marcadas com SPIONs e (ii) por C6 não marcadas (Controle). O estudo foi realizado nos períodos de 14 e 21 dias. As setas indicam o efeito dos SPION na imagem de ressonância magnética

marcadas mostra formação de uma massa com cerca de 6mm de diâmetro máximo, com predomínio de alto sinal em T2. A análise das imagens T2 obtidas aos 14 dias de procedimento da amostra de animais com células marcadas mostra, em contrapartida, áreas de alto sinal periférico e as porções central e superior com marcado baixo sinal em T2\* (presumivelmente determinado por SPION). A evolução entre os dias 14 e 21 do grupo de amostras em animais com células não marcadas apresenta aumento da área de alto sinal em T2, indicando crescimento da massa tumoral, mas sem regiões de marcado baixo sinal em T2. A evolução entre os dias 14 e 21 do grupo de amostras em animais com células marcadas com SPION apresenta aumento da massa, principalmente das porções periféricas de alto sinal em T2, sendo reduzida a área central de baixo sinal. A observação das imagens ponderadas em T2\* mostram achados semelhantes, porém, no grupo de animais com células marcadas por SPION há um achado interessante: surgiu, no dia 21, área de marcado baixo sinal em T2\* contralateral, na projeção do epêndima ventricular, indicando possivelmente presença de SPION (indiretamente células tumorais) no hemisfério contralateral.

Para verificação histológica da distribuição de SPIONs, após as análises de imagem por RM, o tecido tumoral foi submetido à análise histológica para detecção das SPIONs (Figura 4) utilizando fucsina básica contracorada com azul da prússia. Foi evidenciado que, no caso do tecido normal adjacente ao tumor (Figura 4A), não se detectaram SPIONs, mas que, no tecido tumoral, induzido por células C6 marcadas, observam-se SPIONs internamente às células (Figura 4B).



**Figura 4.** Análise histológica do tecido tumoral (fucsina básica contracorada com azul da prússia). (A) Tecido normal adjacente ao tumor no qual não se detectaram SPIONs. (B) Tecido tumoral no qual se observam SPIONs internamente às células. Aumento 400x

## DISCUSSÃO

A avaliação qualitativa do estudo *in vitro* da marcação das células C6 por SPIONs recobertas com aminosilana e complexados com PLL para uma concentração de  $30\mu\text{g Fe/mL}$  foi realizada por microscopia de luz após a coloração de azul da prússia, indicando boa distribuição e satisfatória marcação celular com SPIONs. A eficiência na marcação é um dos fatores importantes para o monitoramento por imagem por RM das células



C6 transplantadas assim como para o acompanhamento do processo de proliferação das células.

Imagem ponderadas em  $T_2$  e  $T_2^*$  são utilizadas para mapeamento de células marcadas com SPIONs, gerando regiões hipointensas. As SPIONs, quando utilizadas como agentes de contraste na imagem por RM, estabelecem um campo dipolar perturbador substancial localizado, que leva a uma notável redução em  $T_2^*$ , juntamente de uma menos notável redução em  $T_1$ , gerando um contraste negativo que aumenta os detalhes e os contornos da imagem<sup>(14-17)</sup>.

No monitoramento realizado por imagem por RM é possível observar, por meio da análise comparativa das imagens realizadas em 14 e 21 dias, que há uma redução do marcado baixo sinal em  $T_2$  e  $T_2^*$  (Figuras 2 e 3), induzido pelas SPIONs, na lesão localizada no lobo frontal esquerdo em topografia parassagital. A localização das áreas escuras são correlacionadas à presença de células de glioma C6 marcadas com SPIONs. A avaliação qualitativa das imagens das figuras 2 e 3 apresenta acúmulo de SPIONs nas células C6 de glioma, mostrando a retenção das SPIONs. No dia 21 (Figuras 2 e 3) observou-se uma difusão radical a partir do local onde foram transplantadas as células e, concomitantemente, uma diminuição na hipointensidade. Esse achado evolutivo pode ser atribuído à diluição do ferro devido à proliferação celular<sup>(18)</sup>, assim como a possível degradação da cobertura (aminosilana) de uma fração de SPIONs e, conseqüentemente, conduzirá à mudança da estrutura cristalina, modificando as propriedades de superparamagnetismo das SPIONs. Outra provável fonte desse marcado baixo sinal é a presença de resíduos de hemoglobina que pode ocorrer em áreas de hemorragias. Com base apenas nas imagens de RM é impossível fazer essa diferenciação. Entretanto, em nossos animais com implante de células não marcadas, este achado não foi observado, sugerindo que a chance de hemorragias no grupo de implante de células marcadas é baixa.

A análise histológica revelou, por meio da marcação com azul da prússia, que, nas células tumorigênicas, ainda encontramos uma vasta distribuição das SPIONs no tecido tumoral. Essas foram encontradas tanto nas células como no meio extracelular, entretanto, não observamos SPIONs nos tecido adjacentes ao tumor (Figura 2).

## CONCLUSÃO

Neste estudo, foi evidenciado que as células de glioma C6 são marcadas de maneira efetiva com SPIONs recobertas com aminosilana e complexados com PLL.

A técnica não invasiva de imagem por RM apresenta-se como uma ferramenta com grande potencial para pesquisar a trajetória da migração de células C6, já que, quando combinada com técnicas de marcação eficiente com SPIONs, permite o monitoramento *in vivo* da migração de célula implantadas por determinados períodos para avaliação do crescimento tumoral de glioblastoma. Este seguimento foi feito mediante a obtenção de RM ponderada no tempo de relaxação transversal  $T_2$  e  $T_2^*$ .

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein - IIEPAE, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

## REFERÊNCIAS

- Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1551(1):M19-27.
- Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histological grading. *J Natl Cancer Inst*. 1972;48(2):347-56.
- Koo YE, Reddy GR, Bhojani M, Schneider R, Philbert MA, Rehemtulla A, et al. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplastforms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(14):1556-77.
- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, et al. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(22):6677-86.
- Billotey C, Asford C, Beuf O, Piaggio E, Gazeau F, Janier MF, et al. T-cell homing to the pancreas in autoimmune mouse models of diabetes: in vivo MR imaging. *Radiology*. 2005;236(2):579-87.
- Lee JS, Kang HJ, Gong G, Jung HD, Lim KH, Kim ST, et al. MR imaging of in vivo recruitment of iron oxide-labeled macrophages in experimentally induced soft-tissue infection in mice. *Radiology*. 2006;241(1):142-8.
- Bourrinet P, Bengel HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol*. 2006;41(3):313-24.
- Ke YQ, Hu CC, Jiang XD, Yang ZJ, Zhang HW, Ji HM, et al. In vivo magnetic resonance tracking of Feridex-labeled bone marrow-derived neural stem cells after autologous transplantation in rhesus monkey. *J Neurosci Methods*. 2009;179(1):45-50.
- Gultepe E, Reynoso FJ, Jhaveri A, Kulkarni P, Nagesha D, Ferris C, et al. Monitoring of magnetic targeting to tumor vasculature through MRI and biodistribution. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(8):1173-82.
- Caruso G, Caffo M, Alafaci C, Raudino G, Cafarella D, Lucerna S, et al. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine*. 2011;7(6):744-52.
- Breton E, Goetz Ch, Kintz J, Accart N, Aubertin G, Grelhier B, et al. In vivo preclinical low-field MRI monitoring of tumor growth following a suicide gene therapy in an orthotopic mice model of human glioblastoma. *C R Biol*. 2010;333(3):220-5.
- Chertok B, Moffat BA, David AE, Yu F, Bergemann C, Ross BD, et al. Iron oxide

- nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*. 2008;29(4):487-96.
13. Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain*. Philadelphia: Elsevier; 1992.
  14. Huang J, Zhong X, Wang L, Yang L, Mao H. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles. *Theranostics*. 2012; 2(1):86-102.
  15. Liu W, Frank JA. Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur J Radiol*. 2009;70(2):258-64.
  16. Wang J, Xie J, Zhou X, Cheng Z, Gu N, Teng G, et al. Ferritin enhances SPIO tracking of C6 rat glioma cells by MRI. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(1):87-93.
  17. Liu W, Dahnke H, Jordan EK, Schaeffter T, Frank JA. In vivo MRI using positive-contrast techniques in detection of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *NMR Biomed*. 2008;21(3):242-50.
  18. Zhang F, Xie J, Liu G, He Y, Lu G, Chen X. In vivo MRI tracking of cell invasion and migration in a rat glioma model. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(4):695-701.